

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

جمهوری اسلامی ایران

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد

عنوان پایان نامه:

بررسی بیان و یا عدم بیان ژن FoxO3a در مدل

بیماری پارکینسون موش صحرایی نژاد ویستار

استاد راهنما: دکتر شهرام دارابی

استاد مشاور: دکتر فرزاد رجایی

نگارش: زهره گل محمدی

سال تحصیلی ۹۵-۱۳۹۴

شماره پایان نامه: ۷۵

## سپاس نامه

نویسنده بر خود لازم می‌داند که از زحمات اساتید و دانشجویان مهربان و دل سوزگروه  
آناتومی و فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی قزوین به خصوص اساتید بزرگوار جناب آقای  
دکتر شهرام دارابی، جناب آقای دکتر فرزاد رجایی و جناب آقای دکتر هاشم حقدوست که  
با راهنمایی‌های خود راه‌گشای این جانب بوده‌اند، قدردانی نماید.  
همچنین از پدر و مادر و همسر مهربانم که در تمامی مراحل زندگی پشتیبان و همراهم  
بوده‌اند کمال تشکر را می‌نمایم.

## چکیده

**مقدمه:** بیماری پارکینسون یک بیماری نورودژنراتیو است که با تجمع پروتئین در سیتوپلاسم نورون‌های مربوطه مشخص می‌شود. استرس اکسیداتیو و نقص عملکرد میتوکندری در این بیماری نقش دارند. اتوفاژی یک مکانیسم حفاظتی در پاسخ به استرس سلول است و عدم تنظیم آن منجر به تجمع پروتئین و آسیب اندامک‌ها در بیماری‌های نورودژنراتیو می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن‌های اتوفاژی در بیماری پارکینسون است.

**روش:** موش‌های صحرایی نژاد ویستار به سه گروه کنترل، شاهد (تزریق سالین آسکوربات به استریاتوم چپ) و تخریب (تزریق سم ۶-هیدروکسی دوپامین به استریاتوم چپ) تقسیم شدند. تست رفتاری با داروی آپومورفین هیدروکلراید یک هفته قبل و چهار هفته پس از جراحی انجام شد. سپس جسم سیاه موش‌ها خارج شد و جهت بررسی بیان ژن‌های FoxO3a، VPS34، Atg101، Atg14L، Atg13 و LC3 از تکنیک RT-PCR استفاده گردید.

**یافته‌ها:** با تزریق آپومورفین موش‌های گروه تخریب پس از چهار هفته چرخش به سمت راست معنی دار نسبت به هفته‌ی قبل از جراحی نشان دادند. در بررسی بیان ژن‌های FoxO3a، LC3، Atg13، Atg14L، Atg101 و VPS34 به روش RT-PCR مشاهده شد که ژن‌های FoxO3a، LC3، Atg13 و VPS34 و Atg14L

در مدل پارکینسون بیان شدند، اما ژن Atg101 بیان نشد. در گروه‌های کنترل و شاهد تمامی ژن‌ها بیان

شدند. تنظیم کاهشی ژن‌های FoxO3a، Atg13، VPS34 و Atg14L در گروه تخریب مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** بیان FoxO3a نشان داد که این ژن در القای اتوفاژی در مدل بیماری پارکینسون از طریق

بیان ژن‌های LC3 و Vps34 نقش دارد. عدم بیان Atg101 در موش‌های گروه تخریب ممکن است بیان‌گر

این باشد مرحله‌ی initiation در اتوفاژی در مدل بیماری پارکینسون ناقص است. همچنین تنظیم کاهشی

ژن‌های FoxO3a، Atg13، VPS34 و Atg14L در موش‌های گروه تخریب می‌تواند بیان‌گر آسیب اتوفاژی

در مرحله القا و شروع اتوفاژی باشد.

**کلمات کلیدی:** بیماری پارکینسون، اتوفاژی، آپومورفین، FoxO3a

# فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه	
۱-۱- مقدمه	۲
۲-۱- بیان موضوع	۶
۳-۱- اهداف و فرضیات	۷
۴-۱- محدودیت‌های تحقیق	۸
۵-۱- کلیات و تعاریف	۹
۱-۵-۱- بیماری پارکینسون	۹
۱-۱-۵-۱- اتیولوژی	۹
۳-۱-۵-۱- تظاهرات بالینی	۱۳
۴-۱-۵-۱- تشخیص	۱۴
۵-۱-۵-۱- درمان	۱۴
۲-۵-۱- عقده‌های قاعده‌ای	۱۵
۴-۲-۵-۱- ارتباطات عقده‌های قاعده‌ای	۱۷
۵-۲-۵-۱- کنترل دوپامینرژیک	۱۹
۱-۳-۵-۱- مدل‌های توکسیک در پارکینسون	۲۱
۱-۱-۳-۵-۱- اجرای سیستمیک	۲۱
۲-۱-۳-۵-۱- اجرای لوکال	۲۴
۴-۵-۱- تغییرات رفتاری پس از تخریب یک طرفه با 6-OHDA	۲۶
۵-۵-۱- تغییرات ساختمانی و بیوشیمیایی پس از تخریب یک طرفه با 6-OHDA	۲۷
۶-۵-۱- اتوفازی	۲۷
۱-۶-۵-۱- اتوفازی به عنوان یک مکانیسم هومئوستازی سلولی	۲۸
۲-۶-۵-۱- القای اتوفازی	۳۰
۳-۶-۵-۱- مشخصه‌های اتوفازی نوروونی	۳۳
۴-۶-۵-۱- تنظیم اتوفازی در بیماری پارکینسون	۳۴
۷-۵-۱- ژن FoxO3a	۳۶
۸-۵-۱- ژن GAPDH	۳۷

۳۸.....	۱-۵-۹- ژن های Atg101 و Atg13
۳۹.....	۱-۵-۱۰- ژن Atg14L
۴۰.....	۱-۵-۱۱- ژن LC3
۴۱.....	۱-۵-۱۲- ژن VPS34

## فصل دوم: بررسی پژوهش‌های قبلی

۴۵.....	۲-۱- بررسی متون
---------	-----------------

## فصل سوم: مواد و روش‌ها

۵۲.....	۳-۱- ابزار و مواد
۵۲.....	۳-۲- گروه‌های مورد مطالعه
۵۳.....	۳-۳- ارزیابی رفتاری قبل از جراحی
۵۴.....	۳-۴- جراحی
۵۶.....	۳-۵- بیهوشی
۵۷.....	۳-۶- بررسی بیان ژن به وسیله واکنش پلیمرز معکوس (RT-PCR)
۵۹.....	۳-۶-۱- استخراج RNA
۶۱.....	۳-۶-۲- تعیین غلظت و خلوص RNA و DNA به روش اسپکتروفوتومتری
۶۳.....	۳-۶-۳- حذف DNA از RNA استخراج شده
۶۳.....	۳-۶-۴- واکنش پلی مرز معکوس
۶۴.....	۳-۶-۵- انجام PCR بر روی cDNA تهیه شده
۶۷.....	۳-۶-۶- بررسی محصول PCR در ژل آگاروز
۶۸.....	۳-۷- آنالیز آماری

## فصل چهارم: نتایج

۷۰.....	۴-۱- بررسی رفتار چرخشی
۷۴.....	۴-۲- بررسی بیان ژن‌ها به روش RT-PCR

## فصل پنجم: بحث

۷۸.....	۵-۱- بحث
۸۶.....	۵-۲- نتیجه گیری
۸۷.....	۵-۳- پیشنهادات
۸۹.....	منابع
۹۶.....	چکیده انگلیسی

## فهرست اشکال

عنوان	صفحه
۱-۱- متابولیسم شیمیایی و آنزیمی دوپامین.....	۱۱
۲-۱- ساختارهای دوپامین و سموم دوپامینرژیک.....	۲۲
۳-۱- تنظیم مولکولی تشکیل اتوفاگوزوم در ماکرواتوفاژی پستانداران.....	۳۳
۱-۳- قرار دادن رت‌ها در دستگاه استرئوتاکسی.....	۵۵
۲-۳- اندازه گیری میزان غلظت و خلوص RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ.....	۶۲
۱-۴- نمودار میانگین تعداد چرخش کونترولترال القا شده توسط آپومورفین.....	۷۳
۲-۴- تصویر بیان ژن‌ها به روش RT-PCR.....	۷۵
۳-۴- داده‌های شبه کمی حاصله از نرم‌افزار Image J.....	۷۶



## فهرست جداول

عنوان	صفحه
۳-۱- پرایمرهای forward و reverse استفاده شده در RT-PCR.....	۵۸
۳-۲- مواد مورد استفاده در واکنش RT-PCR.....	۶۵
۳-۳- مراحل انجام واکنش RT-PCR.....	۶۶
۳-۴- میانگین تعداد کل چرخش به راست القا شده بر اثر آپومورفین.....	۷۲

# فصل اول

## مقدمه

## ۱-۱- مقدمه

بیماری پارکینسون (PD) یک بیماری نورودژنراتیو است که در آن حرکات بدن نامنظم و آرام می‌شود و با فقدان نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه و تجمع پروتئین در سیتوپلاسم نورون‌های مربوطه مشخص می‌شود (۱ و ۲). این بیماری مرتبط با علایم حرکتی مثل لرزش، سختی و کاهش حرکت و ویژگی‌های غیر حرکتی شامل اختلالات شناختی و اعصاب و روان می‌باشد (۳ و ۴). در این بیماری اجسام لوئی (lewy body) در داخل سیتوپلاسم سلول‌های عصبی آسیب دیده وجود دارد (۵ و ۶). سن مهم‌ترین فاکتور در این بیماری می‌باشد (۸). پاتوژن‌های این بیماری مربوط به استرس اکسیداتیو، اختلال عملکرد میتوکندری و تجمع پروتئین است که همگی با اتوفازی مرتبط هستند (۵ و ۶). علت دقیق بیماری پارکینسون ناشناخته باقی مانده است و روش‌های درمانی تنها موجب تسکین علائم می‌شوند و منشاء اصلی بیماری را هدف قرار نمی‌دهند (۸). این بیماری معمولاً با داروی levodopa یا سایر آگونیست‌های دوپامین که جایگزین دوپامین هستند کنترل می‌شود، اما استفاده‌ی طولانی از levodopa موجب دیس‌کینزی<sup>۱</sup> شده و تاثیر آن را محدود کرده است و منجر به ایجاد تلاش‌های وسیع در جهت توسعه‌ی روش‌های درمانی جدید در مسیرهایی به جز جایگزینی دوپامین و پیشرفت در

---

<sup>1</sup>dyskinesia

درمان‌های غیر دوپامینرژیک شده است. در ۱۵ سال گذشته تحریک عمقی مغز یک روش طلایی در نوع پیشرفته‌ی این بیماری شده است (۴ و ۹).

اگرچه اکثر موارد پارکینسون موردی هستند اما حدود ۱۵-۱۰ درصد موارد علت ژنتیکی دارند. پیشرفت‌های قابل توجهی در علل ژنتیکی پارکینسون در طول دهه‌ی گذشته منجر به تشخیص تعدادی از ژن‌های مهم مرتبط با پارکینسون شده است و بسیاری از این ژن‌ها مانند Parkin و PINK 1 و غیره تا کنون شناخته شده‌اند. فهم مکانیسم‌های مولکولی این بیماری برای یافتن راه‌کارهای درمانی جدید بسیار مهم است (۱۰ و ۵).

همان طور که گفته شد از جمله علل پارکینسون که استرس اکسیداتیو، اختلال عمل میتوکندری و تجمع پروتئین است، همگی با اتوفاژی در ارتباط‌اند. اتوفاژی یک فرایند هومئوستازی حفاظتی برای سلول و ضروری برای از بین بردن محتویات سیتوپلاسمی است. مطالعات نشان داده است که تنظیم دقیق اتوفاژی در سلول برای بقای نرونی ضروری و فقدان تنظیم آن منجر به تخریب نرون می‌شود (۱۲ و ۵).

به عنوان یک مکانیسم حفاظتی اولیه که هومئوستاز غذایی و انرژی در پاسخ به استرس را حفظ می‌کند، عدم تنظیم اتوفاژی باعث تجمع پروتئین‌های غیر عادی و آسیب ارگانل‌ها می‌شود که در بیماری‌های نورودژنراتیو دیده می‌شود. از آنجاکه عمل میتوکندری در تعدادی از مدل‌های پارکینسون به

خطر می افتد، نقص در کنترل کیفیت میتوکندری ممکن است یک نقش حیاتی در پاتوژنز پارکینسون داشته باشد. مطالعات نشان داده است که حذف انتخابی میتوکندری به ویژه میتوکندری‌های آسیب دیده، بخشی از یک مسیر هومئوستازی مهم برای کنترل کیفیت ارگانل است و میتوفاژی یک نقش حیاتی در تجزیه‌ی میتوکندری بازی می‌کند و در نتیجه ممکن است برای حفظ نوروں‌های دوپامینرژیک سودمند باشد. از طرفی در بسیاری از بیماری‌های نورودژنراتیو از جمله پارکینسون، تجمع پروتئینی مشخص به عنوان پاتولوژی سلولی دیده شده است و اتوفاژی یکی از سیستم‌های پروتئولیتیک بزرگ است که هومئوستاز پروتئین سلولی را حفظ می‌کند. پس حفظ سطح درستی از اتوفاژی برای حداقل کردن تجمع پروتئین‌های غیر عادی و آسان کردن تجزیه‌ی ارگانل‌های آسیب دیده مهم است. کشف عوامل درمانی که فعالیت اتوفاژی را به میزان درست زیاد کنند یا مستقیماً هومئوستاز میتوکندری را حفظ کنند می‌تواند بالقوه از دست رفتن نورونی را کاهش و سرعت پیشرفت بیماری را کم کند (۱). از طرفی تعدادی از ژن‌های اتوفاژی مرتبط با پارکینسون نیز شناخته شده اند و این ژن‌ها با میتوفاژی هم در ارتباط هستند، مانند Parkin و PINK1 که با هم عمل می‌کنند. جهش در این ژن‌ها با بروز پارکینسون در ارتباط است (۱۳ و ۱). شناسایی ژن‌های اتوفاژی در بررسی وجود یا عدم وجود رابطه این ژن‌ها با بروز پارکینسون مهم است.

از جمله ژن‌های اتوفاژی FoxO3a می‌باشد که ارتباط آن با پارکینسون بهتر است بررسی شود.

FoxO3a یکی از اعضای خانواده‌ی FoxO<sup>2</sup> است و به دلیل نقش منحصر به فردش در تکثیر سلول، آپوپتوز، متابولیسم، اداره‌ی استرس و عمر طولانی سلول بررسی زیادی شده است (۱۴ و ۱۱). تغییرات FoxO3a باعث انواع سرطان‌ها، فیبروز و سایر بیماری‌ها می‌شود. FoxO3a اتوفاژی را برای حفاظت سلول‌ها از استرس‌های محیطی افزایش می‌دهد و بنابراین یک نقش حفاظتی مهم در حفظ هومئوستاز سلولی دارد (۱۴). با این اوصاف ممکن است این ژن و جهش‌های آن با PD در ارتباط باشد.

PI3KC3<sup>3</sup> در اتوفاژی نقش دارد. کمپلکس هسته‌ای انسانی PI3KC3 شامل سه جزء بزرگ و اصلی است که محتوی p150, PI3KC3/hVps34 و Beclin1 است. در مخمر، ATG14 و VPS38 تشکیل کمپلکس متفاوت، لوکالیزاسیون زیر سلولی و فسفریلاسیون لیپیدی core PI3K kinase را میانجی می‌کند که در اتوفاژی عمل می‌کند (۱۵). چند مطالعه نشان داده اند که Beclin 1 در بسیاری از بیماری‌ها از جمله در تخریبات نورونی نقش دارد (۱۶). FIP200 نیز یک پروتئین برهم‌کنش کننده با ULK است که برای تشکیل اتوفاگوزوم در سلول‌های پستانداران نیاز است. یافت شده است که ULK1,2 برای اتوفاژی نیاز می‌باشند (۱۷). LC3 نیز یکی دیگر از ژن‌های اتوفاژی است که در غشاهای اتوفاگوزوم متمرکز می‌شود (۱۸). ATG101 نیز یک پروتئین اتصالی برای ATG13 است که یک جزئی از ULK1 سرین ترئونین

---

<sup>2</sup> forkhead boxo

<sup>3</sup> Class III phosphatidylinositol 3-kinase

کیناز است که برای اتوفاژی نیاز است. کمپلکس ULK1 شامل ATG13 و FIP200 است و برای برای القای اتوفاژی نیاز است. برهم کنش بین ATG101 و ATG13 می‌تواند برای پایداری و فسفریلاسیون پایه‌ی ATG13 و ULK1 مهم باشد (۱۹). GAPDH نقشی در حفظ بقای سلول با بالا بردن گلیکولیز و بهبود اتوفاژی با افزایش بیان ATG12 بازی می‌کند (۲۰).

تمامی ژن‌های نام برده از جمله ژن‌های اتوفاژی‌اند که ارتباط ۵ عدد از این ژن‌ها به نام‌های Atg101، Atg13، VPS34، ATG14L و LC3 با پارکینسون و اینکه آیا در مدل بیماری پارکینسون FoxO3a فعال می‌شود یا نه و در صورت فعال شدن آیا مسیر اتوفاژی و در پی آن آیا این ژن‌های اتوفاژی فعال می‌شوند یا نه بررسی شد. ژن GAPDH برای کنترل داخلی استفاده شد.

## ۱-۲- بیان موضوع

پیشرفت‌های زیادی در جهت فهم پاتوژن‌های بیماری پارکینسون در طول دو دهه‌ی گذشته ایجاد شده است که عمدتاً نتیجه‌اش کشف جهش‌های ژنی خاص بوده است که در آغاز پارکینسون شرکت می‌کنند. اخیراً فقدان تنظیم مسیر اتوفاژی در مغز بیماران پارکینسون و مدل‌های حیوانی پارکینسون مشاهده شده است که به نقش اتوفاژی در این بیماری دلالت دارد. اتوفاژی در تعدادی از پاتوفیزیولوژی‌ها شامل انواع بیماری‌های نورودژنراتیو درگیر است. پاتوژن‌های این بیماری مربوط به استرس اکسیداتیو، نقص عملکرد میتوکندری و تجمع پروتئین است که همه با اتوفاژی مرتبط هستند (۱).

ژن‌های FOXO3a، LC3، Atg13، Atg14L، Atg101 و VPS34 در اتوفازی درگیر هستند پس می‌توانند با PD در ارتباط باشند (۲۴و۲۳و۲۲و۲۱و۱۴و۱۱). پیش از این ژن‌هایی نظیر a-Synuclein، PARKIN و PINK1 شناسایی و ارتباط آنها با PD اثبات شده است (۱).

با در نظر گرفتن این مطالب در تحقیق حاضر تصمیم بر آن شد تا ارتباط ژن‌های FoxO3a، LC3، Atg13، Atg14L، Atg101 و VPS34 با بیماری پارکینسون از طریق ایجاد مدل یکطرفه و اولیه‌ی این بیماری در موش صحرایی نژاد ویستار و سپس بیان این ژن‌ها از طریق روش RT-PCR مورد بررسی قرار گیرد. در این رابطه، بعد از ایجاد مدل یکطرفه‌ی پارکینسون در موش صحرایی از طریق تخریب استریاتوم با نوروتوکسین 6-OHDA، رفتار حرکتی چرخشی حیوان به دنبال تجویز سیستمیک آگونیست دوپامینرژیکی آپومورفین برای اثبات ایجاد پارکینسون در این موش‌ها بررسی شد و سپس استخراج RNA از جسم سیاه، تبدیل آن به cDNA و تکثیر ژن‌های نام‌برده توسط RT-PCR به منظور تعیین بیان ژن‌های نام‌برده انجام شد.

### ۳-۱- اهداف و فرضیات

#### ۳-۱-۱- هدف اصلی طرح

بررسی بیان و یا عدم بیان ژن FoxO3a در مدل بیماری پارکینسون موش صحرایی نژاد ویستار



### ۱-۳-۲- اهداف فرعی

- ۱-۳-۲-۱- بررسی بیان ژن موثر در مسیر اتופاژی LC3 در مدل بیماری پارکینسون
- ۱-۳-۲-۲- بررسی بیان ژن موثر در مسیر اتופاژی VPS34 در مدل بیماری پارکینسون
- ۱-۳-۲-۳- بررسی بیان ژن موثر در مسیر اتופاژی Atg13 در مدل بیماری پارکینسون
- ۱-۳-۲-۴- بررسی بیان ژن موثر در مسیر اتופاژی A101 در مدل بیماری پارکینسون
- ۱-۳-۲-۵- بررسی بیان ژن موثر در مسیر اتופاژی Atg14L در مدل بیماری پارکینسون

### ۱-۳-۳- اهداف کاربردی

در صورت مثبت بودن نتایج تکرار آزمایش در دیگر مدل‌های حیوانی پارکینسون توصیه می‌گردد.

### ۱-۳-۴- فرضیه‌ها یا سؤال‌های پژوهش

آیا در مدل بیماری پارکینسون مسیر سلولی اتופاژی فعال می‌شود؟

### ۱-۴- محدودیت‌های تحقیق

- ۱-۴-۱- گرانی مواد و مشکلات زیاد در تهیه‌ی مواد و نیز طولانی شدن زمان تهیه‌ی مواد به علت مشکلات مالی و نبود بعضی مواد نظیر کیت CDNA در داخل کشور
- ۱-۴-۲- نبود تجهیزات کافی نظیر دستگاه Thermal cycler و ترمو بلاک، دستگاه شیکر و دستگاه استریو تاکس و hot plate در آزمایشگاه گروه آناتومی

## ۱-۵- کلیات و تعاریف

### ۱-۵-۱- بیماری پارکینسون

بیماری پارکینسون یک بیماری نورودژنراتیو است که در آن حرکات بدن نامنظم و آرام می شود و با فقدان نورون های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه و تجمع پروتئین در سیتوپلاسم نورون های مربوطه مشخص می شود (۱ و ۲ و ۳). این بیماری مرتبط با علائم حرکتی مانند لرزش، سختی و کاهش حرکت و ویژگی های غیر حرکتی شامل اختلالات شناختی و اعصاب و روان می باشد (۴ و ۵). سن مهم ترین فاکتور در این بیماری است (۸). مدت زمان بیماری از تشخیص تا مرگ ۱۵ سال است و مردان ۱/۵ برابر بیشتر از زنان مبتلا می شوند (۲۵). اکثر موارد پارکینسون موردی هستند اما حدود ۱۵-۱۰ درصد موارد علت ژنتیکی دارند (۵). هنوز علت دقیق این بیماری ناشناخته باقی مانده است و روش های درمانی تنها موجب تسکین علائم می شوند (۸).

### ۱-۵-۱-۱- اتیولوژی

#### ۱-۵-۱-۱-۱- فاکتورهای محیطی:

علت اصلی بیماری پارکینسون هنوز ناشناخته است و اکثر موارد پارکینسون موردی هستند. مطالعات نشان می دهد که تعدادی از فاکتورها ریسک ابتلا به پارکینسون را افزایش می دهند. این عوامل شامل در معرض قرار گرفتن آب چاه، حشره کش ها، علف کش ها و مواد شیمیایی صنعتی می باشد (۲۶).

#### ۱-۵-۱-۱-۲- فاکتورهای ژنتیکی

حدود ۱۵-۱۰ درصد موارد پارکینسون علت ژنتیکی دارند. پیشرفت‌های قابل توجهی در علل ژنتیکی

پارکینسون در طول دهه‌ی گذشته منجر به تشخیص تعدادی از ژن‌های مهم مرتبط با پارکینسون شده

است. برای مثال، تاکنون کشف شده است که جهش در ژن‌هایی نظیر  $\alpha$  - synuclein، LRRK2<sup>۴</sup>،

PINK1، PARKIN و DJ1 منجر به ایجاد انواع پارکینسون می‌شود (۵).

جهش‌های  $\alpha$  - synuclein منجر به ایجاد فرم نادری از پارکینسون اتوزومال غالب می‌شود. جهش ژن

کد کننده‌ی LRRK2 مسئول یک فرم اتوزومال غالب پارکینسون است (۱). جهش در Parkin که منجر

به پارکینسون موردي و ارثی می‌شود، توانایی پاک‌سازی میتوکندری آسیب دیده از طریق میتوفاژی را

مختل می‌کند (۲۱).

#### ۱-۵-۱-۲- پاتوژنز

#### ۱-۵-۱-۲-۱- استرس اکسیداتیو

استرس اکسیداتیو به علت آن که متابولیسم اکسیداتیو دوپامین، هیدروژن پروکسید ( $H_2O_2$ ) و دیگر

قطعات اکسیژنی فعال ( $ROS^5$ ) را تولید می‌کند، مورد توجه بیشتری قرار گرفته است (شکل ۱-۱).

---

<sup>4</sup> Leucine-rich repeat kinase 2

<sup>5</sup> Reactive oxygen species

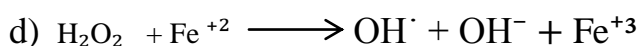
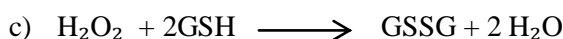
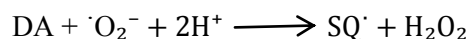
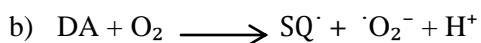
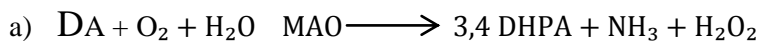
استرس اکسیدانت (گیرنده‌ی الکترون در واکنش اکسیداسیون) و سپس مرگ سلولی می‌تواند تحت

شرایط زیر در بخش متراکم جسم سیاه افزایش یابد:

(a) : افزایش بازگردش دوپامین که منجر به تشکیل پراکسیداسیون اضافی می‌شود.

(b) : نقص در گلوتاسیون (GSH) که باعث کاهش ظرفیت مغز در حذف  $H_2O_2$  می‌شود.

(c) افزایش در آهن فعال که می‌تواند منجر به تشکیل  $OH^\bullet$  شود.



شکل ۱-۱: متابولیسم شیمیایی و آنزیمی دوپامین منجر به تشکیل هیدروژن پراکسید ( $H_2O_2$ ) می‌شود (a,b).  $H_2O_2$

معمولا توسط گلوتاسیون احیا شده (GSH) حذف می‌شود (c). افزایش در غلظت  $H_2O_2$  می‌تواند منجر به واکنش با آهن

فرو ( $Fe^{+2}$ ) شود که رادیکال هیدروکسیل ( $OH^\bullet$ ) بسیار سمی و فعال را تولید می‌کند (واکنش fenton) (d).

حقیقتا مطالعات در مغز بیماران پارکینسونی افزایش آهن، کاهش GSH و آسیب اکسیداتیو به

چربی‌ها، پروتئین‌ها و DNA را نشان می‌دهد که بیان‌کننده‌ی این است که بخش متراکم جسم سیاه در

مرحله‌ی استرس اکسیدانت قرار دارد (۲۶).

۱-۵-۱-۲-۱-۱- آهن

مطالعات متعدد ثابت کرده‌اند که سطوح آهن در جسم سیاه بیماران پارکینسون افزایش می‌یابد. بررسی‌ها نشان می‌دهند که آهن ابتدا درون گرانول‌های نوروملانی نوروپایمنرژیک تجمع می‌یابد. مدارک نشان می‌دهند که این آهن ممکن است در شکل فعال خودش باشد. وارد کردن آهن در بخش متراکم جسم سیاه جوندگان، مدلی از پارکینسون را معرفی می‌کند که با فقدان پیشرونده‌ی دوپامین استریاتال، دژنراسیون نورون‌های SNc<sup>۱</sup> و تغییرات رفتاری مشخص می‌شود (۲۶ و ۲۷).

#### ۱-۵-۱-۲-۱-۲- گلوتاسیون

وجود اشکال در فرایند حفاظت‌های آنتی اکسیدانی که به طور طبیعی در بدن روی می‌دهند، می‌تواند منجر به نورودژنراسیون در پارکینسون شود. کاهش انتخابی گلوتاسیون احیا شده (GSH) در SNc بیماران پارکینسون دیده می‌شود. کاهش در GSH ممکن است پاک‌سازی H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> را مختل کند و تشکیل  $OH^{\bullet}$  را به ویژه در حضور آهن افزایش یافته القا کند. علت کاهش GSH در پارکینسون ناشناخته است (۲۶).

#### ۱-۵-۱-۲-۱-۳- آسیب اکسیداتیو

مدارکی دال بر آسیب اکسیداتیو در مغز بیماران پارکینسونی وجود دارد. سطوح افزایش یافته‌ی پراکسیداسیون لیپیدی باعث تولید مالون دی آلدئید (MDA) و لیپید هیدروپراکسید می‌شود که در SNc بیماران پارکینسونی یافت شده‌اند.

---

<sup>۶</sup> Substantia nigra pars compacta

4-hydroxynonenal که تولیدی از پراکسیداسیون لیپیدی است و ظرفیت تغییر پروتئین‌ها و القای

سمیت سلولی را دارد در نورون‌های دوپامینرژیک باقی‌مانده مشاهده شده است. به علاوه، افزایش پروتئین

کربونیل و 8-hydroxy-2-deoxyguanosine انعکاس دهنده‌ی آسیب اکسیداتیو پروتئین‌ها و DNA است که

به ترتیب در SNc و مناطق متعدد دیگری از مغز بیماران پارکینسونی مشاهده شده است (۷ و ۲۶).

#### ۱-۵-۱-۲-۲- نقص عملکرد میتوکندری

کاهش ۳۰-۴۰ درصدی در فعالیت کمپلکس I زنجیره‌ی تنفسی میتوکندری در SNc بیماران

پارکینسونی مشاهده می‌شود. نقص کمپلکس I میتوکندری می‌تواند در تخریب سلولی از طریق کاهش

سنتز ATP و نقص بیوانرژی‌تیک شرکت کند. به هر حال، مطالعات در حیوانات آزمایشگاهی نشان می‌دهد

که کاهش در فعالیت کمپلکس I از ۴۰ درصد به پایین، سطوح ATP سلولی را به خطر نمی‌اندازد. نقص

کمپلکس I میتوکندری می‌تواند همچنین منجر به آسیب سلولی از طریق رادیکال‌های آزاد تولید شده در

این منطقه یا از طریق افزایش جبرانی در تنفس کمپلکس II میتوکندری شود. همچنین، نقص در

کمپلکس I ممکن است در توسعه‌ی آپوپتوز شرکت کند (۲۶).

#### ۱-۵-۱-۳- تظاهرات بالینی

علائم بیماری پارکینسون بی سر و صدا و غافلگیر کننده است و به تدریج بدتر می‌شود. لرزش در

حالت استراحت اغلب اولین نشانه شناخته شده توسط بیمار است. اما بیماری گاهی اوقات با برادی‌کینزی

شروع می‌شود و در بعضی از بیماران لرزش ممکن است هرگز ایجاد نشود. منظور از برادی کینزی آهسته و کند شدن در نوشتن، کاهش حرکت بازو و لنگش پا در هنگام راه رفتن، کاهش حالت صورت و کاهش دامنه‌ی صدا می‌باشد.

#### ۱-۵-۴- تشخیص

تشخیص بیماری پارکینسون بدون ظهور برادی کینزی امکان پذیر نیست. برادی کینزی ممکن است به محض ورود بیماران به اتاق مشاوره و یا وقتی از بیمار خواسته می‌شود که لباسش را برای معاینه درآورد، دیده شود. حالت چهره می‌تواند بی حرکت و سخت باشد و توان بیان احساسات آهسته است. صحبت کردن هم ممکن است آهسته و بدون ریتم باشد. کاهش حس بویایی و بعد از آن، توهم بینایی نیز دلیلی برای پارکینسون هستند (۲۵).

#### ۱-۵-۵- درمان

تاکنون هیچ دارو یا جراحی نتوانسته است صریحا و به طور برجسته میزان پیشرفت پارکینسون را آهسته کند. جایگزینی دوپامین یک روش اصلی برای درمان پارکینسون است. موثرترین دارو levodopa است و معمولا با یک متوقف کننده‌ی دکربوکسیلاز محیطی برای جلوگیری از تشکیل دوپامین در بافت های اطراف تجویز می‌شود. اگر چه لوودوپا موثرترین دارو برای درمان علائم پارکینسون است، اما حدود

۶۰ درصد از بیماران بعد از ۵ سال استفاده از لوودوپا علائم دیس کینزی را خواهند داشت که در بیماران کمتر از ۶۰ سال این مسئله بارزتر است.

داروهای قوی بعدی برای درمان علائم پارکینسون آگونیست‌های دوپامین هستند. در مقایسه با لوودوپا، احتمال اینکه آگونیست‌های دوپامین منجر به سایکوز، گیجی و توهم به ویژه در افراد مسن شوند بیشتر است. بنابراین استفاده از لوودوپا در بیماران بالای ۷۰ سال ایمن‌تر است. از طرف دیگر درمان با آگونیست‌های دوپامین کمتر منجر به دیس کینزی می‌شود.

جراحی برای پارکینسون به طور فزاینده رو به پیشرفت است. از مشکلات جراحی پر هزینه بودن آن است. به نظر می‌رسد که هسته‌ی ساب تالامیک بهترین هدف برای کنترل برادی کینزی باشد و می‌تواند منجر به کاهش دوز لوودوپا نیز شود و بنابراین شدت دیس کینزی را کاهش دهد (۲۹).

## ۱-۵-۲ - عقده‌های قاعده‌ای

عقده‌های قاعده ای گروهی از هسته‌های ساب کورتیکال هستند و در کنترل انواع اعمال رفتاری حرکتی و غیر حرکتی نقش مهمی بر عهده دارند. این هسته‌ها مانند پلی بین دیانسفال و تالانسفال هستند (۳۱ و ۳۰). هسته‌های قاعده‌ای از چهار هسته‌ی اصلی تشکیل شده‌اند. این هسته‌ها شامل استریاتوم، گلوبوس پالیدوس، هسته‌ی ساب تالامیک و جسم سیاه می‌باشند. اما سایر هسته‌ها مانند



کمپلکس مرکزی تالاموس یا هسته‌ی پدانکولوپونتین نیز نقش بزرگی در عملکرد عقده‌های قاعده‌ای بازی می‌کنند (۳۲).

#### ۱-۵-۲-۱- جسم مخطط (کورپوس استریاتوم)

به مجموعه‌ی هسته‌ی دم دار و هسته‌ی عدسی، استریاتوم می‌گویند. هسته‌ی دم دار C شکل است و از جلو به عقب شامل سر، تنه و دم می‌باشد. دم در انسان بسیار کوچک است. هسته‌ی عدسی از پوتامن<sup>۷</sup> و گلوبوس پالیدوس<sup>۸</sup> تشکیل شده است که گلوبوس پالیدوس خود، از دو بخش اکسترنال (GPe) و اینترنال (GPi) تشکیل شده است. پوتامن و گلوبوس پالیدوس از محل پیوستن دیانسفال و تالانسفال برمی‌خیزند. شکل هسته‌ی عدسی مثلث شکل است.

#### ۱-۵-۲-۲- هسته‌ی ساب تالامیک

هسته‌ی ساب تالامیک (STN<sup>۹</sup>) از ستون سلولی خارجی هایپوتالامیک دیانسفال در ناحیه‌ای که زیر تالاموس و بالای دیانسفال قرار گرفته است به وجود می‌آید. شکل آن به صورت یک لنز محدب الطرفین است (mm ۱۲\*۵\*۳ در انسان) که به صورت مایل بر روی سه صفحه‌ی آناتومیک جهت گرفته است (۳۲).

#### ۱-۵-۲-۳- جسم سیاه

---

<sup>۷</sup> putamen  
<sup>۸</sup> globus palidus  
<sup>۹</sup> Subthalamic nucleus

جسم سیاه یک ساختار مزانسفالیک است که شامل دو بخش اصلی است : بخش متراکم (SNc) و بخش مشبک ('SNr). جسم سیاه بین ناحیه‌ی ساب تالامیک و مزانسفال وسعت یافته است. شکل آن به صورت بیضی مسطح است و دور محور طولی خودش پیچ خورده است. طول آن در جهت سری-دمی ۲/۵ mm و عرض آن ۳ mm می‌باشد (۳۲و۳۳).

#### ۱-۵-۲-۴- ارتباطات عقده‌های قاعده‌ای

اطلاعات اصلی سیستم عقده‌های قاعده‌ای از کورتکس مغزی می‌آیند. بخش شکمی استریاتوم نیز پروجکشن برجسته‌ای از آمیگدال دریافت می‌کند. اطلاعات استریاتال به GPi ، SNr و سپس به تالاموس (هسته‌های وینترال آنتریور و وینترال لترال) و از آنجا به کورتکس فرونتال، ناحیه‌ی حرکتی مکمل (SMA) برای خروجی پالیدال و کورتکس پره فرونتال دورسولترال برای خروجی نیگراال انتقال می‌یابد. این حلقه‌ی کورتیکو کورتیکال از طریق مسیر مستقیم مدارهای عقده‌های قاعده‌ای می‌گذرد. در مسیر دیگر (مسیر غیر مستقیم)، GPe سپس STN و از آنجا GPi و بخش مشبک جسم سیاه درگیر هستند.

استریاتوم و در درجه‌ی کمتر، گلوبوس پالیدوس و STN یک ورودی بزرگ دوپامینرژیک از بخش متراکم جسم سیاه دریافت می‌کنند. این کنترل برای تعادل فعالیت مسیرهای مستقیم و غیر مستقیم ضروری است.

---

<sup>10</sup> pars reticulata

کمپلکس مرکزی ساب تالاموس (کمپلکس میانی مرکزی پارافاسیکولار) ارتباط قوی با سیستم عقده های قاعده ای در پستانداران دارد. GPi پروجکشن به قسمت مرکزی کمپلکس (هسته ی میانی مرکزی) دارد و آن نیز در جهت برگشت به پوتامن حسی حرکتی پروجکت می کند. در حالی که SNr به بخش داخلی اش (هسته ی پارافاسیکولار) پروجکت می شود و آن نیز به هسته ی دم دار پروجکت می کند. هسته ی پدائکولو پونتین پروجکشن های برجسته ای به عقده های قاعده ای، عمدتاً بخش متراکم جسم سیاه و STN دارد. این هسته ورودی اصلی اش را از GPi دریافت می کند.

#### ۱-۵-۲-۴-۱ مکان های عملکردی

مطالعات پروجکشن کورتیکواستریاتال سال ها قبل در میمون نشان داده است که دو مکان عملکردی بر طبق نواحی کورتیکال مبداء می تواند در استریاتوم تفکیک شود: منطقه ی حسی حرکتی و منطقه ی ارتباطی

منطقه ی حسی حرکتی عمدتاً در پوتامن قرار گرفته است و پروجکشن دو طرفه از کورتکس دریافت می کند. ناحیه ی ارتباطی عمدتاً در هسته ی دم دار قرار گرفته است و پروجکشن های هومولترال را از کورتکس های فرونتال، پرینتال، تمپورال و اکسیپیتال دریافت می کند.

امروزه، سیستم عقده های قاعده ای اغلب به سه ناحیه ی عملکردی تقسیم شده است:

(۱) ناحیه‌ی حسی حرکتی (پوتامن) که به کورتکس‌های حرکتی (کورتکس حرکتی اولیه، SMA،

کورتکس پره موتور) پروجکت می‌شود.

(۲) ناحیه‌ی ارتباطی (هسته‌ی دم دار پشتی) که به کورتکس پره فرونتال پروجکت می‌شود.

(۳) ناحیه‌ی لیمبیک (استریاتوم شکمی) که به کورتکس سینگولیت قدامی و کورتکس‌های

اریتوفرونتال داخلی پروجکت می‌شود.

این نواحی به ترتیب اطلاعات حرکتی، شناختی و احساسی را پردازش می‌کنند (۳۲).

#### ۱-۵-۲-۵- کنترل دوپامینرژیک

با در نظر گرفتن ارتباط الکتروفیزیولوژی و بیوشیمی مدار عقده‌های قاعده‌ای، یک مدل فانکشنال از

سیستم عقده‌های قاعده‌ای ساخته شده است که توضیحی برای شرایط نرمال و پاتولوژیکال، یعنی

اختلالات حرکتی هایپر کینتیک و هایپو کینتیک فراهم می‌کند. این مدل از زمانی شروع شد که مشاهده

کردند استریاتوم یک ساختار یکنواخت نیست بلکه هتروژنوس بوده و شامل توزیعی از پایانه‌های دوپامینی

است. این موضوع بر پایه‌ی دو مفهوم است: وجود زیر مجموعه‌ای از نورون‌های پروجکشنی استریاتال و

اثر متفاوت دوپامین بر روی دو جمعیت.

گمان می‌رود نورون‌هایی که محتوی نوروپپتید ماده P هستند عمدتاً به GPe و SNr پروجکت می

شوند، در حالیکه نورون‌هایی که محتوی انکفالین هستند به GPe پروجکت خواهند شد (مسیر غیر

مستقیم). در مورد اثر متفاوت دوپامین، مطالعات فراساختاری نشان داده است که ترمینال‌های دوپامینرژیک مستقیماً با نورون‌های استریاتال و نه با نورون‌های کولینرژیک سیناپس می‌کنند. آنتاگونیست‌های دوپامینرژیک باعث کاهش غلظت ماده‌ی P در استریاتوم و SNr می‌شوند. مطالعات الکتروفیزیولوژیک در موش‌هایی که تحت MPTP یا 6OHDA قرار گرفته‌اند نشان می‌دهد که فعالیت GPe کاهش و GPi افزایش می‌یابد و غلظت ماده‌ی P در GPi در بیماران پارکینسون کاهش می‌یابد. فعالیت مسیر مستقیم یک اثر تحریکی بر روی پروجکشن تالاموکورتیکال دارد که منجر به تولید حرکت یا رفتار می‌شود. در مقایسه، فعالیت مسیر غیر مستقیم منجر به فعالیت STN و سپس افزایش توقف پروجکشن تالاموکورتیکال می‌شود. بر هم کنش بین این دو مسیر به طور کامل روشن نشده است. دوپامین یک نقش اساسی در این مدل بازی می‌کند. دوپامین اثر تحریکی روی مسیر مستقیم و اثر توقفی روی مسیر غیر مستقیم دارد، بنابراین اجرای حرکت و رفتار را ممکن می‌کند. در پارکینسون غیاب دوپامین منجر به عدم توقف GPi و SNr و افزایش توقف پروجکشن تالاموکورتیکال می‌شود و منجر به برادی کینزی و آکینزی می‌شود.

این مدل از چند جهت مورد بحث است:

نخست آن که این مدل اشاره می‌کند براین که دو جمعیت نورون‌های استریاتال دو گیرنده‌ی دوپامینرژیک متفاوت دارند (گیرنده‌ی D1 برای مسیر مستقیم و D2 برای مسیر غیر مستقیم) و این که دوپامین اثر

تحریکی روی گیرنده‌های D1 و اثر مهاری روی گیرنده‌های D2 دارد. این پیش‌بینی حمایت شده است اما داده‌های اخیر نشان می‌دهند که بسیاری از نورون‌های استریاتال گیرنده‌های دوپامینرژیک D1 و D2 را با هم دارند و دوم آنکه در این مدل فرض می‌شود نورون‌های استریاتال به GPe یا GPi و نه به هر دو هسته ی هدف پروجکت می‌شوند. (۳۲).

### ۱-۵-۳- مدل تجربی بیماری پارکینسون

بیماری پارکینسون یک بیماری انسانی است اما می‌توان مدل‌های پارکینسون را در حیوانات به صورت توکسیک ایجاد کرد که هر کدام مزایا و معایب خاص خودشان را دارند.

### ۱-۵-۳-۱- مدل‌های توکسیک در پارکینسون

در این مدل از نوروتوکسین‌هایی استفاده می‌شود که تخریب انتخابی نورون‌های نیگرا استریاتال را القا می‌کنند. این سموم می‌توانند بسته به نوع سموم استفاده شده و گونه‌ی مورد نظر به صورت سیستمیک یا لوکال اجرا شوند (۵).

### ۱-۵-۳-۱-۱- اجرای سیستمیک

### ۱-۵-۳-۱-۱-۱- MPTP

<sup>۱۱</sup>MPTP توکسیسته انتخابی برای نورون‌های دوپامینرژیک می باشد (شکل ۱-۲). در اواسط سال

۱۹۸۰، در کالیفرنیا شمالی به دلیل تزریق وریدی ترکیبی از مپردین محتوی MPTP به کاربران جوان

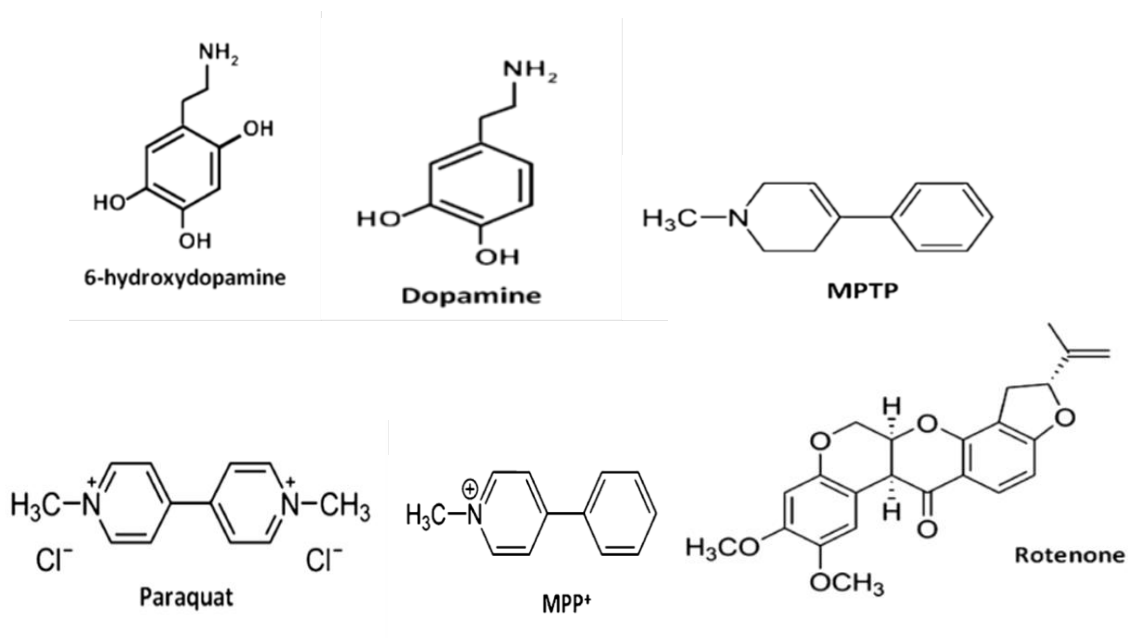
این دارو، پارکینسونیسم قابل توجهی ایجاد شد. MPTP بعد از عبور از سد خونی مغزی توسط مونو آمین

اکسیداز B به متابولیت فعالش یعنی  $MPP^+$  تبدیل می‌شود که سپس توسط انتقال دهنده‌ی دوپامین به

درون نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه انتقال می‌یابد و در آنجا فعالیت کمپلکس I

میتوکندری را متوقف می‌کند. محدودیت بزرگ مدل MPTP این است که آسیب SNc همراه با تشکیل

اجسام لوئی نمی‌باشد (۳۸ و ۳۶ و ۳۵ و ۵).



شکل ۱-۲: ساختارهای دوپامین و سموم دوپامینرژیک

<sup>۱۱</sup> 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

#### ۱-۵-۳-۱-۱-۲- آفت کش‌ها

#### ۱-۵-۳-۱-۱-۲- روتنون

Betarbet et al در سال ۲۰۰۰ یک مدل جدید ارائه دادند که بر پایه‌ی اجرای درون وریدی و مزمن

(۵ روز) روتنون به رت‌ها بود. روتنون با طیف گسترده‌ای به عنوان آفت کش استفاده می‌شد (شکل ۱-۲).

روتنون به علت چربی دوست بودن به راحتی از سد خونی مغزی عبور می‌کند و بر خلاف  $MPP^+$  نیاز به

انتقال دهنده‌ی دوپامین برای ورود به نورون‌های دوپامینرژیک ندارد. روتنون فعالیت کمپلکس I

میتوکندری را متوقف می‌کند و نیز فعالیت پروتئازومی را متوقف می‌کند و بنابراین استرس پروتئولیتیک

را ایجاد می‌کند. در رت‌ها، روتنون باعث تخریب انتخابی نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه می‌شود. از

معایب روتنون این است که پاسخ‌های متعدد در افراد نسبت به سموم وجود دارد. همچنین مورتالیتی

مساله دیگری است و سایر اندام‌ها نیز به این سم حساس هستند (۵).

#### ۱-۵-۳-۱-۱-۲- پاراکوات

مدل سیستمیک دیگر اجرای پاراکوات است که از نظر ساختاری شبیه  $MPP^+$  است ولی مکانیسم

عمل آن کاملاً متفاوت است (شکل ۱-۲). از آنجایی که یک مولکول باردار نمی‌تواند از سد خونی مغزی

عبور کند، بنابراین پاراکوات می‌تواند توسط انتقال دهنده‌ی آمینواسیدی خنثی وارد مغز شود. یک



مکانیسم وابسته به سدیم می‌تواند پاراکوات را مستقل از انتقال دهنده‌ی دوپامین (DAT) به درون نورون ببرد. در سطح سیتوزولی، پاراکوات استرس اکسیداتیو زیادی را به وسیله‌ی عمل به عنوان ترکیبی از چرخه‌ی اکسیداسیون تولید می‌کند. پاراکوات برای نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه بسیار انتخابی است. اگرچه مرگ سلولی در حد متوسط (۲۰-۳۰ درصد) می‌باشد و تنها بعد از تزریقات متعدد مشاهده می‌شود. کاهش فعالیت حرکتی و فقدان وابسته به تزریق فیبرهای دوپامینرژیک جسم سیاه در موش‌های سوری بدون کاهش اساسی در دوپامین جسم مخطط گزارش شده است (۵۳۸و۵).

#### ۱-۵-۳-۱-۲- اجرای لوکال

#### ۱-۵-۳-۱-۲-۱- 6-hydroxydopamine (6-OHDA)

مدل نخستین و اصلی بر پایه‌ی تزریق لوکال نوروتوکسین، 6-OHDA (۶ - هیدروکسی دوپامین) است (شکل ۱-۲). 6-OHDA یک آنالوگ هیدروکسیله از دوپامین با میل ترکیبی زیاد با DAT می‌باشد. تزریق لوکال به علت آنکه سم نمی‌تواند از BBB یا سد خونی مغزی عبور کند، ضروری است. بعد از تزریق به درون SNc یا دستجات داخلی پیشین مغز که فیبرهای وایبان را از سلول‌های جسم سیاه به جسم مخطط می‌برند، 6-OHDA باعث تخریب گسترده‌ی این مسیر می‌شود. نورون‌های SNc در ۱۲ ساعت اول بعد از تزریق شروع به مرگ می‌کنند. این روش بیشترین سطح مرگ سلولی در جسم سیاه و تخلیه‌ی دوپامین جسم مخطط در مدل‌های حیوانی را به همراه دارد (۹۰-۱۰۰ درصد). تزریق معمولاً به شکل

یکطرفه انجام می‌شود و نیمکره‌ی مخالف به عنوان کنترل در نظر گرفته می‌شود، زیرا تزریق دوطرفه مورتالیتیه‌ی زیادی را به همراه دارد.

در اواسط سال ۱۹۹۰، یک روش دیگر برای تزریق 6-OHDA ارائه شد که در آن این سم به درون استریاتوم تزریق شد. این تزریق یک آسیب فوری به ترمینال‌های استریاتال القا می‌کند و به دنبال آن فقدان نورون‌های بخش متراکم جسم سیاه به صورت پیشرونده و تاخیری و به صورت رتروگرا در می‌دهد. درجه‌ی آسیب به بخش متراکم جسم سیاه در این روش در مقایسه با روش اول کمتر است و در حدود سه تا چهار هفته طول می‌کشد تا مقدار کافی از نورون‌های بخش متراکم جسم سیاه تخریب شوند. این مدل به مدل انسانی پارکینسون که در آن تخریب نورونی به صورت تدریجی رخ می‌دهد شباهت بیشتری دارد.

مکانیسم عمل 6-OHDA اساساً مربوط به نقش پرو اکسیدانی آن است. در ابتدا در نورون، 6-OHDA در سیتوزول تجمع می‌یابد و اتواکسیداسیون سریع را پیش می‌برد و منجر به تشکیل میزان زیادی هیدروژن پراکسید می‌شود. 6-OHDA همچنین می‌تواند در میتوکندری تجمع یابد و فعالیت کمپلکس I را متوقف کند.

آسیب یکطرفه‌ی ایجاد شده توسط 6-OHDA می‌تواند رفتار چرخشی ایجاد کند، در پاسخ به داروهایی که قادر به تحریک گیرنده‌های دوپامین استریاتوم هستند، هم به شکل مستقیم مثل

آپومورفین<sup>۱۲</sup> و هم به شکل غیر مستقیم مثل آمفتامین<sup>۱۳</sup> که رهاسازی دوپامین از ترمینال‌های استریاتال را در نیمکره‌ی سالم مغز تحریک می‌کنند. در مورد آپومورفین، حیوانات در جهت مخالف محل آسیب خواهند چرخید، در حالی که در مورد آمفتامین، حیوانات در جهت موافق محل تزریق خواهند چرخید. عدم تقارن واضح و بی اختیار به عنوان نتیجه‌ای از آسیب حرکتی اندام در جهت مخالف نیمکره‌ی تزریق شده نیز ظاهر می‌شود و می‌تواند توسط تست‌های رفتاری گوناگون ارزیابی شود. آسیب حرکتی متاثر از تزریق 6-OHDA در حیوانات زمانی همیشگی است که حیوانات آسیب نیگرااستریاتال را به شکل کامل (۹۵ درصد) داشته باشند (۳۸ و ۳۷ و ۵).

#### ۴-۵-۱ - تغییرات رفتاری پس از تخریب یکطرفه با 6-OHDA

با تزریق یکطرفه‌ی 6-OHDA به درون استریاتوم رت، بخش زیادی از نورون‌های دوپامینرژیک تخریب می‌شوند و سطح دوپامین در استریاتوم همان طرف کاهش می‌یابد. بعد از تزریق یکطرفه، رت‌ها برای مدت کوتاهی یک عدم تقارن حرکتی خود به خودی (چرخش به همان طرف) را نشان خواهند داد، اما به زودی این عدم تقارن از بین می‌رود مگر آن که یک محرک فیزیکی به حیوان وارد شود. با تجویز سیستمیک آگونیست‌های دوپامینرژیک مانند آپومورفین، یک رفتار حرکتی چرخشی در حیوان آشکار می‌شود (۴۲ و ۴۱ و ۳۹).

---

<sup>12</sup> Apomorphine

<sup>13</sup> Amphetamine

با تخریب سمت چپ سیستم دوپامینرژیک نیگرا استریاتال، تراکم گیرنده‌های نوع D<sub>2</sub> دوپامینرژیک بر روی نورون‌های هدف استریاتال به علت حالت تنظیم افزایشی زیاد می‌شود و بنابراین با تجویز داروهایی که مستقیماً بر روی گیرنده‌ها اثر می‌گذارند، فعالیت حرکتی در سمت چپ نسبت به راست بیشتر شده و حیوان به سمت مقابل یعنی سمت راست می‌چرخد (۴۵ و ۴۴ و ۴۳ و ۳۷).

### ۱-۵-۵- تغییرات ساختمانی و بیوشیمیایی پس از تخریب یکطرفه با 6-OHDA

سطح دوپامین حدود چهار هفته بعد از تزریق 6-OHDA به درون استریاتوم، در استریاتوم و جسم سیاه همان طرف به مقدار زیادی کاهش می‌یابد. همچنین مشخص شده است که تعداد اجسام سلولی دارای آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز (آنزیم ضروری برای سنتز دوپامین) در جسم سیاه همان سمت کاهش می‌یابد (۴۶). همچنین افزایش حساسیت در گیرنده‌های دوپامینرژیک ایجاد می‌شود (۴۵).

### ۱-۵-۶- اتوفاژی

کاتابولیسم<sup>۱۴</sup> فرایندی است که در بازیافت مواد سلولی توسط تجزیه‌ی پروتئین‌ها یا حتی تمام ارگانل‌ها شرکت می‌کند. در طول فرایندهای کاتابولیکی، پراکسیدها و رادیکال‌های آزاد می‌توانند تولید شوند. پراکسیدها و رادیکال‌های آزاد مولکول‌هایی هستند که از متابولیسم اکسیژن منشأ می‌گیرند و در تمام ارگانیسم‌های هوازی وجود دارند. آنزیم‌های آنتی اکسیدان (سوپر اکسید دیس موتاز، کاتالاز و

---

<sup>14</sup> catabolism

گلو تاسیون پراکسیداز)، سلول‌ها را از اثرات سمی قطعات اکسیژنی فعال حفظ می‌کنند. به هر حال فرایند نا متعادل تولید و مصرف قطعات اکسیژنی فعال منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود. هومئوستاز سلولی توسط تجمعات درون سلولی پروتئین‌های غیر عادی، آنزیم‌های غیر فعال و ارگانل‌های آسیب دیده مختل می‌شود. پاسخ سلول یوکاریوتیک مقدماتی دو سیستم بزرگ برای تجزیه‌ی پروتئین دارد: سیستم پروتئازومی و اتوفاژی؛ به هر حال اتوفاژی توانایی تجزیه و نابودی تمام ارگانل‌ها را دارد.

اتوفاژی یک فرایند هومئوستازی سلولی حفاظتی و ضروری برای از بین بردن محتویات سیتوپلاسمی است (۱۲۲). محتویات سیتوپلاسمی بزرگ، ارگانیسم‌ها (باکتری‌ها و ویروس‌ها)، و پروتئین‌های قابل حل توسط اتوفاژی تجزیه و برای سنتز مولکول‌های جدید دوباره استفاده می‌شوند. به طور کلی این فرایند با تغییر شرایط محیطی نظیر محرومیت غذایی، استرس اکسیداتیو و اشعه‌ی فرابنفش القا می‌شود. به هر حال اتوفاژی مرتبط با فرایندهای نرمال مانند تکامل، تمایز و حفاظت در برابر پاتوژن‌ها است. علی‌رغم نقش حفاظتی اتوفاژی برای سلول، اتوفاژی می‌تواند در آسیب سلول هم شرکت کند (۲۲).

#### ۱-۵-۶-۱ اتوفاژی به عنوان یک مکانیسم هومئوستازی سلولی

معمولاً سه نوع اتوفاژی وجود دارد: ماکرواتوفاژی، میکرواتوفاژی و اتوفاژی میانجی شده توسط

چاپرون (CMA).

(a) ماکرو اتوفآژی: ماکرو اتوفآژی تحت شرایط استرس، محرومیت غذایی، عفونت و سموم فعال می‌شود. در ماکرو اتوفآژی، یک وزیکول با دو لایه‌ی غشا در اطراف محتویات سیتوزولی شکل می‌گیرد و با لیزوزوم ادغام می‌شود. در ماکرو اتوفآژی مطالعات گسترده‌ای انجام شده است و پروسه‌ی آن مشخص شده است.

(b) میکرو اتوفآژی: در میکرو اتوفآژی، لیزوزوم خودش یک پروتئین یا ارگانل هدف را احاطه می‌کند. زمانی که یک پراکسیزوم یا میتوکندریون در بر گرفته شود، این فرایند پکسوفآژی<sup>۱۵</sup> یا میتوفآژی<sup>۱۶</sup> نام می‌گیرد.

(c) اتوفآژی میانجی شده توسط چاپرون: این نوع اتوفآژی یک گروه معین از پروتئین‌ها را هدف می‌گیرد که محتوی pentapeptide KFERQ یا سکانس‌های مشابه هستند. این اتوفآژی مستلزم تشکیل وزیکول نمی‌باشد، زیرا تمام سوبستراها یک کمپلکس با چاپرون سیتوزولی به نام پروتئین شوک حرارتی ۷۰ تشکیل می‌دهند که به پروتئین غشایی نوع 2a (Lamp2a) که گیرنده‌ای بر روی غشای لیزوزوم است، اتصال می‌یابند و سپس وارد لیزوزوم شده و توسط هیدرولازها تجزیه می‌شوند (۱۴۷).

تمامی فرایندهای ذکر شده در بالا، تعادل درون سلولی را حفظ می‌کنند. زمانی که مکانیسم‌های هومئوستازی سلولی کامل نمی‌شود، مرگ حتمی است. این فرایند منجر به القای میتوز در سلول‌های

---

<sup>15</sup> pexophagy

<sup>16</sup> mitophagy

مجاور برای حفظ اینتگریتی بافت می‌شود. در بافت مغز بزرگسالان، این فرایند جایگزینی نمی‌تواند روی دهد، زیرا نورون‌ها نمی‌توانند تقسیم شوند. نورون‌ها مجبور به تنظیم تمام فرایندهای درون سلولی برای بقا هستند. بنابراین تنظیم صحیح اتوفاژی برای بقای نورونی ضروری است و عدم کارکرد صحیح آن منجر به بیماری‌های نورودژنراتیو می‌شود.

یک دستگاه مولکولی مسئول برای اتوفاژی وجود دارد. مولکول‌های تخصص یافته از قبیل کیناز، فسفاتاز و آنزیم‌هایی که می‌توانند به گوانوزین تری فسفات متصل و آن را هیدرولیز کنند (GTPase)، در این فرایند شرکت می‌کنند و همگی توسط ژن‌های مرتبط با اتوفاژی (Atg) کد می‌شوند (۲۲).

#### ۱-۵-۶-۲- القای اتوفاژی

مسیرهای رایجی برای سیگنالینگ اتوفاژی در پستانداران و سایر ارگانیسم‌ها وجود دارد. پروتئینی به نام کیناز هدف راپامیسین در پستانداران یا mTOR، نقشی حیاتی در القای اتوفاژی بازی می‌کند. هدف راپامیسین در پستانداران (mTOR) به شکل فسفریله‌اش (شکل فعال) به عنوان تنظیم کننده‌ی منفی اتوفاژی عمل می‌کند و این کار را با هایپر فسفریلاسیون Atg13 انجام می‌دهد. ماکرواتوفاژی از طریق فسفریلاسیون کمپلکس (ULK1, ULK2, FIP200, ATG13, ATG101) شروع می‌شود. بسته به سطح انرژی سلولی، فسفریلاسیون اجزای ULK1 (Ser758) که منجر به توقف کمپلکس ULK1 می‌شوند توسط TORC1 (کمپلکس ۱ هدف راپامیسین پستانداران) تنظیم می‌شود، درحالی‌که فسفریلاسیون

اجزای ULK1 (Ser317, Ser377) که در فعال سازی کمپلکس ULK1 درگیر هستند توسط AMPK (AMP-activated protein kinase) تنظیم می‌شود.

کمپلکس ULK1 فعال، پروتئین‌های ATG6 (Beclin1 در پستانداران) را به محل تشکیل اتوفاگوزوم بسیج می‌کند و beclin1(BECN1) را روی Ser14 فسفریله می‌کند و فعالیت کمپلکس VPS34( PI3KCIII , BECN1, ATG14L, VPS15) را برای شروع تشکیل اتوفاگوزوم پیش می‌برد. فرایند اتوفاژی شامل چند مرحله است (شکل ۱-۳):

۱) Nucleation : در طول فرایند nucleation، کمپلکس VPS34 منجر به تولید فسفاتیدیل اینوزیتول تری فسفات (PI3P) می‌شود. تجمع PI3P باعث بسیج شدن پروتئین‌های اتصال یابنده به PI3P می‌شود. BECN1 که یک پروتئین ضروری برای کمپلکس VPS34 است، پارتنرهای اتصال یابنده‌ی زیادی مانند ATG14L, UVRAG, BCL2 دارد. از طریق این پارتنرهای برهم کنش کننده، سرانجام BECN1 اتوفاژی را تحت شرایط استرسی گوناگون تنظیم می‌کند. زمانی که مرحله‌ی nucleation شروع می‌شود، غشای اتوفاگوزوم منبسط می‌شود.

۲) elongation : در این فرایند، غشای اتوفاگوزوم نیاز به دو سیستم شبه یوبی کوئیتین برای وسعت دادن غشا در اطراف سوبستراهای سیتوزولی دارد:



الف) در سیستم کونجوگاسیون Atg5-Atg12، پروتئین Atg12 به عنوان اولین پروتئین شبه یوبی کوئیتین (UbI) شناخته شده است. Atg12 توسط Atg7 (E1 like anzyme) فعال می‌شود و سپس به Atg10 (E2 like anzyme) منتقل می‌شود و سپس به Atg5 متصل می‌شود. سرانجام Atg12-Atg5 با Atg16 بر هم کنش کرده و کمپلکس Atg12-Atg5-Atg16 غشاهایی که وابسته به تشکیل PI3P هستند را هدف می‌گیرد.

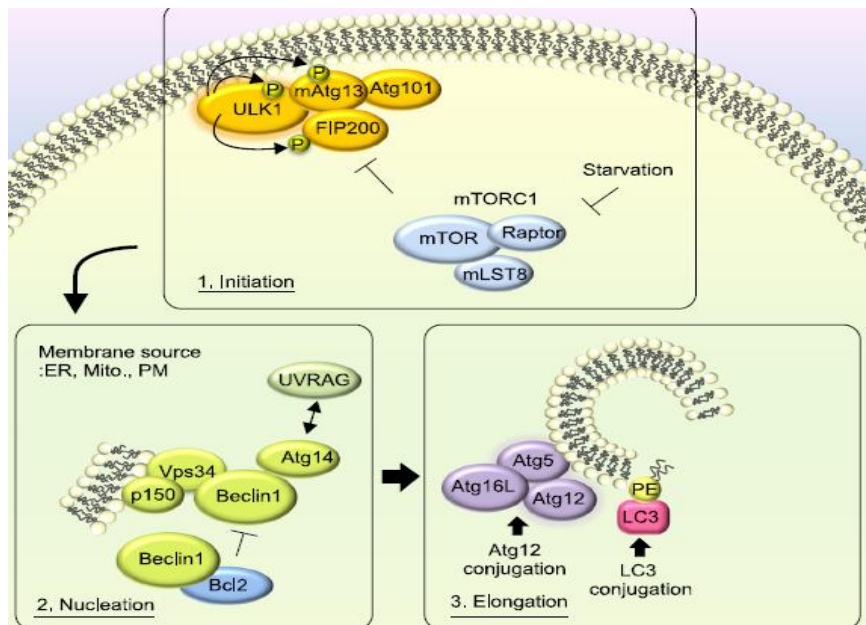
ب) سیستم کونجوگاسیون شبه یوبی کوئیتین دوم، سیستم کونجوگاسیون Atg8 (معادل LC3 در پستانداران) است. Atg8 توسط پروتئاز سیستئینی به نام Atg4 شکافته می‌شود و توسط آنزیم‌های شبه یوبی کوئیتین Atg7 و Atg3 پردازش می‌شود. کونجوگه ی-PE Atg8- بر روی غشای فاگوفور قرار می‌گیرد و در بسیج محموله به اتوفاگوزوم شرکت می‌کند.

۳) maturation: در مرحله ی بلوغ و جوش خوردن به لیزوزوم، اتوفاگوزوم‌ها به لیزوزوم جوش خورده و اتوفاگولیزوزوم تشکیل می‌شود. غشاهای خارجی آن‌ها با هم جوش خورده و غشاهای درونی همراه با تشکیلاتشان به داخل لومن لیزوزوم/ اتولیزوزوم رها می‌شوند. مطالعات اخیر نشان داده اند که پروتئین‌های SNARE ، endosomal COPs ، ESCRT III complex ، small GTPase Rab proteins ، chaperone HSP70 family proteins و TECPR1 اجزای حیاتی در بلوغ اتوفاگوزوم هستند.

مراحل نهایی فرایند اتوفاژی، نابودی و بازیافت است که تجزیه‌ی محموله توسط هیدرولازهای

لیزوزومی و سایر آنزیم‌های پروتئولیتیک انجام می‌شود. بعد از تجزیه، آمینواسیدها، نوکلئوتیدها و سایر

اجزا به درون سیتوزول رها شده و بازیافت می‌شوند (۲۱، ۲۲ و ۲۳ و ۲۴).



شکل ۱-۳: تنظیم مولکولی تشکیل اتوفاگوزوم در ماکرواتوفاژی پستانداران، سه مرحله‌ی اصلی شامل initiation ،

nucleation و elongation در تشکیل اتوفاگوزوم نشان داده شده است. ER: شبکه اندوپلاسمی. Mito: میتوکندری. PM:

غشای پلاسمایی. PE: فسفاتیدیل اینوزیتول

### ۱-۵-۶-۳- مشخصه‌های اتوفاژی نورونی

به طور کلی گزارش شده است که فرایند اتوفاژی نورون‌ها را حفاظت می‌کند. اتوفاژی نورونی برای

پلاستیسیته سیناپسی، عملکرد ضد التهابی در سلول‌های گلیال، تکامل الیگودندروسیت‌ها و پروسه‌ی

میلین سازی ضروری است. پروتئین‌های تجمع یافته در نورون نمی‌توانند توسط تقسیم سلولی رقیق

شوند زیرا نورون‌ها تقسیم میتوز انجام نمی‌دهند. بنابراین نورون‌ها نیاز به یک سیستم تنظیم شده‌ی کنترل کیفی پروتئین دارند. تغییر فعالیت سیستم تجزیه‌ی پروتئینی منجر به تجمع پروتئین‌های غیر عادی و سرانجام منجر به نقص عملکرد نورونی می‌شود. مدارک فزاینده نشان می‌دهند که اتوفاژی در بیماری‌های نورونی مانند آلزایمر و پارکینسون درگیر می‌شود (۲۱).

#### ۱-۵-۶-۴ - تنظیم اتوفاژی در بیماری پارکینسون

پارکینسون با تجمع  $\alpha$ -synuclein (SNCA) و یوبی کوئیتین درون انکلوژیون‌های سیتوپلاسمی که اجسام لوئی نامیده می‌شوند، مشخص می‌شود. اکثر موارد PD اسپورادیک هستند یعنی علتشان ناشناخته است و تنها ۵ درصد موارد PD در نتیجه‌ی جهش‌های حداقل ۶ ژن SNCA, GBA, PINK1, DJ, LRRK2, PARKIN (PARK2) هستند. تخریب اتوفاژیک در نورون‌های میلینه‌ی جسم سیاه در بیماران PD مدارکی را فراهم می‌کند که اتوفاژی مرتبط با PD است. همچنین بیان شده است که پروتئین‌های کد شده توسط ژن‌های مرتبط با PD می‌توانند مسیر اتوفاژی را تنظیم کنند. ماکرو اتوفاژی، CMA و میتوفاژی در PD درگیر می‌شوند.

سطح SNCA یک عامل تعیین کننده‌ی مهم از نورو توکسیسیته‌ی آن و مرتبط با تشکیل اجسام لوئی است. بنابراین تجزیه‌ی SNCA برای یافتن درمان PD ضروری است. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که SNCA در حالت دیوبیکوئیتینه عمدتاً توسط اتوفاژی نابود می‌شود، درحالی‌که SNCA در حالت مونو

یوبیکوئیتینه ترجیحا توسط پروتئازوم حذف می‌شود. در موش‌های ترنس ژنیک SNCA، سیستم یوبی کوئیتین پروتئازوم مسیر تجزیه‌ی اصلی برای SNCA تحت شرایط نرمال است، در حالیکه اتوفاژی در زمان افزایش SNCA درون سلولی عمل می‌کند.

جهش ژن کد کننده‌ی LRRK2 مسئول نوعی از اتوزومال غالب PD است. چندین گزارش نشان داده اند که LRRK2 ممکن است ماکرواتوفاژی را تنظیم کند. LRRK2 عمدتا در اجسام مولتی وزیکولار و وزیکول‌های اتوفاژیک قرار دارد. جهش LRRK2 منجر به آسیب اتوفاژی و تجمع پروتئین‌های مارکر اتوفاژی LC3 و P62 می‌شود (۱۲۱).

میتوفاژی نیز با نقش ژن‌های مرتبط با پارکینسون اتوزومال مغلوب مرتبط است. Parkin (یک لیگاز شبه E3 سیتوزولی) در حالت نرمال و استراحت عمدتا در سیتوزول قرار دارد اما در مواقع آسیب میتوکندری به درون میتوکندری آسیب دیده برای پاک‌سازی جابه‌جا می‌شود. بنابراین جهش در Parkin که منجر به پارکینسون موردی و ارثی می‌شود توانایی پاک‌سازی میتوکندری آسیب دیده از طریق میتوفاژی را مختل می‌کند. دیپولاریزاسیون میتوکندری منجر به تجمع Pink1 روی غشای خارجی میتوکندری آسیب دیده می‌شود و Parkin را بسیج می‌کند. سپس Parkin تعدادی از پروتئین‌های میتوکندری را بر روی میتوکندری با یوبیکوئیتین نشان‌دار می‌کند و منجر به بسیج تعدادی از اجزای اتوفاژی شامل P62 برای نابودی میتوکندری آسیب دیده از طریق میتوفاژی می‌شود (۴۷ و ۱۲۱).

## ۱-۵-۷- FoxO3a ژن

پروتئین‌های FoxO به عنوان تنظیم کننده‌های مهم پروتئین‌های حیاتی مرتبط با فانکشن‌های گوناگون سلول هستند. تا کنون در انسان، FoxO1, FoxO3a, FoxO4 و FoxO6 یافت شده اند. هر یک از اعضای FoxO نقش‌های خاص دارند و از این میان FoxO3a به دلیل نقش منحصر به فردش در تکثیر سلول، آپوپتوز، متابولیسم، اداره‌ی استرس و عمر طولانی سلول بررسی زیادی شده است. تغییرات foxo3a باعث انواع سرطان‌ها، فیبروز و سایر بیماری‌ها می‌شود.

FoxO3a به وسیله‌ی تغییرات پس ترجمه‌ای شامل فسفریلاسیون، استیل‌شدن و یوبی‌کوئیتینه شدن تنظیم می‌شود. هر کدام بر فعالیت رونویسی پروتئین‌های FoxO تاثیر می‌گذارد. توانایی و قدرت FoxO3a با فسفریلاسیون تنظیم می‌شود. مطالعات اثبات می‌کند که وجود FoxO3a در سیتوپلاسم نه تنها آن را غیر فعال می‌کند بلکه یک گام ضروری برای تجزیه‌ی FoxO3a است. استیل‌اسیون هم روی FoxO3a تاثیر می‌گذارد (۱۴ و ۱۱).

## ۱-۵-۷-۱ نقش‌های FoxO3a

### ۱-۵-۷-۱-۱ آپوپتوز و تکثیر سلول

FoxO3a پروتئین‌های مهار چرخه‌ی سلولی به نام‌های P21 و P27 را افزایش می‌دهد. مطالعات نشان داده است که تغییر FoxO3a مرتبط با تکثیر زیاد سلول‌های T کمکی است. FoxO3a همچنین چندین ژن

هدف مثل TRAIR-BiM، PVMA و Fas ligand را افزایش می‌دهد که همگی آپوپتوز سلول را پیش می‌برند. برای مثال FoxO3a مستقیماً به ناحیه‌ی پروموتور Bim وصل می‌شود و باعث مرگ نورون‌های سمپاتیک می‌شود. بنابراین FoxO3a یک ساپرس کننده‌ی تومور است.

#### ۱-۵-۷-۲- مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو

FoxO3a همچنین در حفاظت سلول‌ها وقتی در معرض شرایط نا مطلوب و استرس قرار می‌گیرند، شرکت می‌کند. ROS تنظیم نشده آپوپتوز را القا می‌کند. Sirtuin1 (sirt 1) سطوح ROS را کاهش می‌دهد و بقای سلول را تحت شرایط استرس اکسیداتیو پیش می‌برد. FoxO3a و سایر خانواده‌ی FoxO، سوپر اکسید دیس موتاز (SOD) را افزایش و سلول‌ها را در یک مسیر وابسته به sirt 1 از استرس اکسیداتیو حفاظت می‌کنند.

#### ۱-۵-۷-۳- طول عمر سلول

FoxO3a چون به وسیله‌ی سیگنالینگ (IIS) insulin-IGF1 تنظیم می‌شود که بر متابولیسم کلسیم و طول عمر ارگانیزم تاثیر می‌گذارد، بنابراین کاندیدی برای مطالعه‌ی طول عمر سلول است (۱۴).

#### ۱-۵-۸- ژن GAPDH

<sup>۱۷</sup> GAPDH یک پروتئین گلیکولیتیک اصلی با نقش اساسی در تولید انرژی است. به هر حال مطالعات ثابت کرده اند که GAPDH یا تعدادی از ایزوفرم‌هایش عملکردهایی دارند که مرتبط با نقش گلیکولیتیک آن نیست. برای مثال، فعالیت فسفوترنسفرز/ کیناز، اتوفسفریلاسیون یا فسفریلاسیون سایر پروتئین‌ها که بنابراین به عنوان یک کیناز سلولی عمل می‌کند. نقش آن به عنوان یک پروتئین متصل شونده به توبولین، پلیمریزاسیون توبولین را به میکروتوبول کاتالیز می‌کند. به هر حال، GAPDH همچنین به عنوان هدف نیتریک اسید یا یک پروتئین متصل شونده برای نوکلئیک اسیدها عمل می‌کند همچنین به عنوان یک پروتئین متصل شونده به DNA، عمل به عنوان پروتئین هسته‌ای غیر هیستونی که در تقویت بیان ژن دخالت می‌کند و نیز به عنوان پروتئین صدور tRNA هسته‌ای ایفای نقش می‌کند. GAPDH به عنوان یک گلیکوزیلاز یوراسیل DNA و نیز یک پروتئین متصل شونده به A p4 A در تکثیر و ترمیم DNA نقش دارد.

GAPDH همچنین نقشی در بیماری‌های نورودژنراتیو بازی می‌کند که با افزایش تکرارهای CAG مشخص می‌شود و منجر به توقف فعالیت GAPDH و برهم کنش پروتئین- پروتئین GAPDH با ataxin، atrophin، huntingtin و گیرنده‌ی آندروژن یا پروتئین پیش‌ساز B-amyloid می‌شود (۴۹).

## ۱-۵-۹- ژن‌های Atg101 و Atg13

<sup>17</sup> Glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase

Atg ها در تشکیل اتوفاگوزوم ها و مسیرهای مربوطه درگیر هستند. در انسان بیش از ۳۰ ژن Atg شناخته شده است. تعدادی از آن ها تکرارهای مونو نوکلئوتید با هفت نوکلئوتید یا بیشتر دارند. از تعداد زیادی ژن اتوفاژی، Atg اصلی ترین است. Atg101 یک پروتئین اتصالی برای Atg13 است که یک جزئی از سرین-ترئونین کیناز ULK1 است که برای اتوفاژی نیاز است. کمپلکس ULK1 شامل هم Atg13 و هم FIP200 است و برای القای اتوفاژی نیاز است. FIP200 نیز یک پروتئین بر هم کنش کننده با ULK است که برای تشکیل اتوفاگوزوم در سلول های پستانداران نیاز است. ULK1,2 برای اتوفاژی نیاز می باشند (۵۰ و ۱۹ و ۱۷). نقش فیزیولوژیکی Atg101 در مسیر اتوفاژی هنوز به خوبی مشخص نشده است (۱۹). mTOR (تنظیم کننده ی اتوفاژی در پستانداران) در حالت فعال سنتز پروتئین را پیش می برد و توقف کاتابولیسم را با کاهش ماکرو اتوفاژی از طریق مکانیسمی که توسط فسفریلاسیون Atg13 میانجی می شود، تنظیم می کند (۲۲).

## ۱-۵-۱۰ - ژن Atg14L

Atg14L که احتمالا همولوگ پستانداری AtG14 در مخمر است، محتوی دو زنجیره ی coiled-coil است که برای اتصال به ناحیه ی CCD در Beclin1 و Vps34 نیاز است. به طور کلی، AtG14L در کمپلکس Beclin1-Atg14L-Vps34-Vps15 وجود دارد که برای بیوسنتز اتوفاگوزوم ضروری است. در فیزیولوژی نرمال، Atg14L در هسته است اما ممکن است در طول القای اتوفاژی به غشای فاگوفور



جابه‌جا شود. Atg14L برای مراحل اولیه‌ی بیوسنتز اتوفاگوزوم نیاز است. به علاوه، حضور Atg14L درون سلولی عمدتاً بستگی به پروتئین Beclin1 دارد. برای مثال گفته شده است که فقدان Beclin1 منجر به کاهش زیاد پروتئین‌های Atg14L می‌شود (۱۶).

## ۱-۵-۱۱- ژن LC3

Atg8 در مخمر در تشکیل اتوفاگوزوم‌ها عمل می‌کند. حداقل سه خانواده از پروتئین‌های پستانداری مرتبط با Atg8 به نام‌های LC3، GATE16 و GABARAP وجود دارد. هر خانواده زیر شاخه‌هایی دارد و سه زیر شاخه‌ی انسانی LC3<sup>۱۸</sup> شامل LC3 A، LC3 B و LC3 C هستند. تصور می‌شود که LC3 ارتولوگی از Atg8 است. LC3 در غشاهای اتوفاگوزومی متمرکز می‌شود. عملکرد دقیق و محل دو همولوگ دیگر نامشخص است. GABARAP ممکن است در GABA-receptor clusterin یا انتقال درگیر باشد. گفته می‌شود که GATE16 به صورت یک تنظیم کننده‌ی انتقال درون گلژی است که با NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) و SNARE GOS-28 Golgi V- بر هم کنش می‌کند. هر سه همولوگ Atg8 یک GLY حفاظت شده نزدیک به انتهای C خودشان دارند که با PE-acceptor site در مخمر مطابقت می‌کند. LC3 بعد از GLy120 در مدت شش دقیقه از سنتز در سیتوپلاسم شکافته می‌شود، در نتیجه یک LC3 I سیتوزولی که ۱۸ کیلو دالتون است تولید می‌شود. سپس زیر مجموعه‌ای از LC3 I تبدیل به LC3 II می‌شود که یک پروتئین ۱۶ کیلو دالتونی است و در غشاهای اتوفاگوزومال

---

<sup>18</sup> light chain 3

متمرکز می‌شود و اتوفاژی را القا می‌کند. مقدار LC3 II مرتبط با تعداد اتوفاگوزوم‌ها می‌باشد. تبدیل LC3 می‌تواند برای کنترل فعالیت اتوفاژی استفاده شود، به هر حال طبیعت LC3 II هنوز ناشناخته است. LC3 II یک شکل اتصالی محکم به غشا است. تشکیل LC3 II بستگی به Atg7 و Atg3 پستانداری دارد و همچنین به Atg5 و اتصال با Atg12 بستگی دارد. تبدیل GATE16 I و GABARAP I به نوع دوم، ظرفیت اتصالی به اتوفاگوزوم‌ها را مانند LC3 بهبود می‌بخشد (۱۸و۵۱).

## ۱-۵-۱۲- ژن VPS34

<sup>۱۹</sup>Vps34 عضوی از خانواده‌ی PI3K<sup>۲۰</sup> از لیپید کینازها می‌باشد که همگی موقعیت 3' hydroxy حلقه‌ی فسفاتیدیل اینوزیتول را فسفریله می‌کنند. اولین نقش شناخته شده از Vps34 تنظیم vesicular trafficking در سیستم اندوزومی- لیزوزومی است، یعنی جایی که Vps34 در بسیج کردن پروتئین‌های محتوی ناحیه‌ی اتصالی PtdIns3P به غشاهای داخل سلولی درگیر می‌شود. به هر حال، Vps34 همچنین در سایر پروسه‌های سیگنالینگ شامل حس مربوط به تغذیه‌ی سلول در مسیر mTOR در سلول‌های پستانداران، سیگنالینگ trimeric G-protein به MAPK<sup>۲۱</sup> در مخمر و اتوفاژی در مخمر و ارگانسیم‌های پیشرفته‌تر درگیر است.

## ۱-۵-۱۲- ساختار و فعالیت کاتالیتیک Vps34

<sup>۱۹</sup> vacuolar protein sorting

<sup>۲۰</sup> phosphoinositide 3-kinase

<sup>۲۱</sup> mitogen activated protein kinase

Vps34 (class III PI3K) یک لیپید کیناز است. هومولوژی بین Vps34 و p110α (class IA PI3K)

نشان می‌دهد که Vps34 فعالیت PI3K را دارد. در پستانداران، hVps34 (همولوگ پستانداری Vps34) به طور فراگیر در همه جا بیان می‌شود. PI3Kها توسط ویژگی‌های سوبسترا و سازمان بندی زیر واحدی دسته بندی می‌شوند.

آنزیم‌های کلاس I که  $\text{PtdIns (3,4,5) P}_3$  را در vivo تولید می‌کنند، همگی محتوی زیر واحدهای کاتالیتیکی ۱۱۰ کیلودالتونی همولوگ ( $\alpha$ ,  $\beta$ , Y,  $\delta$ ) هستند. زیر واحدهای تنظیمی برای آنزیم‌های کلاس I شامل  $\alpha$ ,  $\beta$ , p55  $\alpha$ , p55 Y هستند. آنزیم‌های کلاس I B ( $\text{p101}$ ) از نظر ساختاری مرتبط نیستند. PI3K های کلاس II ترکیب  $\text{PtdIns (3,4,5) P}_3$  را تولید نمی‌کنند اما به نظر می‌رسد هم  $\text{PtdIns3P}$  و هم  $\text{PtdIns (3,4) P}_2$  را در vivo تولید می‌کنند. سرانجام تنها class III PI3K یعنی Vps34 فقط  $\text{PtdIns3P}$  را تولید می‌کند. این آنزیم به طور نزدیک مرتبط با یک پروتئین کیناز به نام Vps15 است که گاهی به عنوان یک زیر واحد تنظیمی برای Vps34 توصیف می‌شود (۵۲).

## ۱-۵-۱۲-۲- Vps34 و اتوفاژی

Vps34 برای ماکرواتوفژی ضروری است. تعدادی از ژن‌های Vps مخمر شامل Vps34 و Vps15 برای اتوفژی نیاز هستند (۲۲و۵۲). Vps34 یکی از پر مطالعه‌ترین پروتئین‌های اتوفژی پستانداران است که در دسته‌ی vesicle nucleation قرار می‌گیرد. Beclin1 نیز یک پروتئین اتوفژی در پستانداران است که این

نقش را به عنوان بخشی از کمپلکس اصلی که محتوی Vps34 است انجام می‌دهد. Beclin1 نه تنها به عنوان یک پروتئین اتوفاژی بلکه به عنوان یک پارتنر بر هم کنش کننده برای پروتئین ضد آپوپتوزی BCL-2 کشف شده است. تنظیم فعالیت کمپلکس لیپید کیناز Beclin1-PI3KC3(Vps34) یک عنصر اساسی در مسیر سیگنال‌دهی اتوفاژی است. در شرایط نرمال BCL-2 این کمپلکس را مهار می‌کند. UVRAG با Beclin1 بر هم کنش می‌کند و منجر به فعالیت اتوفاژی می‌شود. نقش اولیه ی Beclin1 تشکیل کمپلکس با PI3KC3 است که در مرحله ی اولیه ی تشکیل اتوفاگوزوم شرکت می‌کند (۱۶).

مطالعات اخیر نشان می‌دهند که hVps34 پستانداری برای فعال سازی مسیر mTOR/ S6K1 (S6 kinase1) نیاز است که سنتز پروتئین را در پاسخ به دسترسی غذایی تنظیم می‌کند. هم در سلول‌های مخمر و هم در پستانداران classIII PI3K ها همچنین برای القای اتوفاژی در طول محرومیت غذایی و استرس نیازند و بنابراین classIII PI3K ها هم در تنظیم اتوفاژی و هم در سنتز پروتئین از طریق مسیر mTOR درگیر هستند (۵۲).

## فصل دوم

### بررسی پژوهش‌های قبلی

## ۲-۱- بررسی متون

بیماری پارکینسون یک بیماری نورودژنراتیو است که در آن حرکات بدن نامنظم و آرام می‌شود و با فقدان نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه و تجمع پروتئین در سیتوپلاسم نورون‌های مربوطه مشخص می‌شود (۱ و ۲ و ۳). پاتوژن‌های این بیماری استرس اکسیداتیو، اختلال عملکرد میتوکندری و تجمع پروتئین است که همگی با اتوفازی مرتبط هستند (۵ و ۱). در حدود ۱۵-۱۰ درصد موارد پارکینسون علت ژنتیکی دارند. پیشرفت‌های قابل توجه در علل ژنتیکی پارکینسون در طول دهه‌ی گذشته منجر به تشخیص تعدادی از ژن‌های مهم مرتبط با پارکینسون شده است و بسیاری از این ژن‌ها مانند Parkin و PINK 1 تا کنون شناخته شده اند. فهم مکانیسم‌های مولکولی این بیماری برای یافتن راه‌کارهای درمانی جدید بسیار مهم است (۱۰ و ۵).

روش اصلی برای ایجاد مدل بیماری پارکینسون در موش صحرایی بر اساس تزریق 6-OHDA روش اصلی است. در اواسط سال ۱۹۹۰، یک روش برای تزریق 6-OHDA ارائه شد که در آن این سم به درون استریاتوم تزریق شد. این تزریق یک آسیب فوری به ترمینال‌های استریاتال القا می‌کند و فقدان نورون‌های بخش متراکم جسم سیاه به صورت پیشرونده و رتروگرا د رخ می‌دهد. درجه‌ی آسیب به بخش متراکم جسم سیاه در این روش در مقایسه با روش‌های دیگر کمتر است و چهار هفته طول می‌کشد تا مقدار کافی از نورون‌های بخش متراکم جسم سیاه تخریب شوند. این مدل به مدل انسانی پارکینسون که

در آن دژنراسیون نورونی به صورت تدریجی رخ می‌دهد شباهت بیشتری دارد. آسیب یکطرفه‌ی ایجاد شده توسط 6-OHDA می‌تواند رفتار چرخشی ایجاد کند، در پاسخ به داروهایی مثل آپومورفین که رها سازی دوپامین از ترمینال‌های استریاتال را در نیمکره‌ی سالم مغز تحریک می‌کند (۵).

با تخریب سمت چپ سیستم دوپامینرژیک نیگرا استریاتال، تراکم گیرنده‌های نوع  $D_2$  دوپامینرژیک بر روی نورون‌های هدف استریاتال به علت حالت تنظیم افزایشی زیاد می‌شود و بنابراین با تجویز داروهایی که مستقیماً بر روی گیرنده‌ها اثر می‌گذارند، فعالیت حرکتی در سمت چپ نسبت به راست بیشتر شده و حیوان به سمت مقابل یعنی سمت راست می‌چرخد (۴۵ و ۴۴ و ۴۳ و ۳۷).

Melinda A و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیان کرده‌اند که اتوفازی به عنوان یک مکانیسم حفاظتی اولیه است و عدم تنظیم آن باعث تجمع پروتئین‌های غیر عادی و آسیب ارگانل‌ها می‌شود که رایجاً در بیماری‌های نورودژنراتیو مانند آلزایمر، هانتینگتون و پارکینسون مشاهده شده است (۱).

Maryam Mehrpour و همکاران در سال ۲۰۱۰ اظهار نموده‌اند که اتوفازی در سطح نرمال و اساسی در اکثر سلول‌ها به عنوان یک مکانیسم کنترل کیفی برای حذف تجمعات پروتئینی، ارگانل‌های آسیب دیده و سایر ساختارهای غیر فعال سیتوپلاسمی رخ می‌دهد. برای مثال، تجمع پروتئین‌های پلی یوبیکوئیتینه در نورون‌ها بعد از خراب کردن Atg5 یا Atg7 در مغز موش‌ها مشاهده شده است (۵۳).

کاهش ۳۰-۴۰ درصدی در فعالیت کمپلکس I زنجیره‌ی تنفسی میتوکندری در SNe بیماران پارکینسونی مشاهده شده است. نقص کمپلکس I می‌تواند در تخریب سلولی از طریق کاهش سنتز ATP شرکت کند. نقص در کمپلکس I همچنین ممکن است در توسعه‌ی آپوپتوز شرکت کند (۲۶). میتوفاژی با نقش ژن‌های مرتبط با پارکینسون اتوزومال مغلوب مرتبط است. Parkin در حالت استراحت عمدتاً در سیتوزول قرار دارد اما در مواقع آسیب میتوکندری، به درون میتوکندری آسیب دیده برای پاک‌سازی جابه‌جا می‌شود. بنابراین جهش در Parkin توانایی پاک‌سازی میتوکندری آسیب دیده از طریق میتوفاژی را مختل می‌کند. به علاوه دیپولاریزاسیون میتوکندری منجر به تجمع Pink1 روی غشای خارجی میتوکندری آسیب دیده می‌شود و Parkin را بسیج می‌کند. سپس Parkin منجر به بسیج تعدادی از اجزای اتوفاژی شامل P62 برای نابودی میتوکندری آسیب دیده از طریق میتوفاژی می‌شود. متأسفانه، هنوز ارتباط مستقیم بین میتوفاژی و علت پارکینسون مشخص نشده است (۱).

Melinda A و همکاران در سال ۲۰۱۲ همچنین بیان کرده‌اند که مطالعات اخیر از موش‌های ترنس ژنیک، حیوان و مدل‌های سلولی پارکینسون درگیری پروتئین‌هایی را نشان می‌دهد که از نظر ژنتیکی با پارکینسون اتوزومال غالب به ویژه  $\alpha$ -synuclein و LRRK2 در مسیر اتوفاژی ارتباط دارند. به علاوه پروتئین‌های مرتبط با پارکینسون اکتسابی مثل PARKIN و PINK1 یک نقش مهم در فرایند



میتوفاژی دارند. جهش و تغییرات پس ترجمه‌ای در این ژن‌ها و پروتئین‌ها در بیماران پارکینسون

مشاهده شده است (۱۵۴)

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که FoxO3a می‌تواند به عنوان سرکوب گر تومور با تنظیم بیان ژن‌های

درگیر در آپوپتوز، توقف چرخه‌ی سلولی، مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو و اتوفاژی عمل کند.

FoxO3a اتوفاژی را برای حفاظت سلول‌ها از استرس‌های محیطی افزایش می‌دهد و بنابراین یک نقش

حفاظتی مهم در حفظ هومئوستاز سلولی دارد. جالب‌ترین ویژگی مرتبط با عمر سلول است (۱۴).

فعال شدن FoxO ها منجر به بیان پروفایل مجموعه‌ی بزرگی از ژن‌های هدف آن‌ها می‌شود که

بسیاری از پروسه‌های سلولی شامل اتوفاژی را تنظیم می‌کنند. تغییر در فعالیت FoxO ها مرتبط با دیابت،

سرطان، نازایی، نورودژنراسیون، اختلال سیستم ایمنی و بیماری‌های قلبی است. FoxO3 می‌تواند اتوفاژی

را از طریق تنظیم افزایشی LC3 ، Gabarap ، Vps34 ، ULK2 و Atg12 القا کند (۲۳).

FoxO3a و sirt 1 یک کمپلکس در سلول‌ها در پاسخ به استرس اکسیداتیو تشکیل می‌دهند و sirt1،

توانایی FoxO3a را برای القای ایست چرخه‌ی سلولی و مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو افزایش

می‌دهد. اما مهار عمل FoxO3a باعث القای مرگ سلولی می‌شود (۱۴).

Ian X.McLeod و همکاران در سال ۲۰۱۱ بیان کرده‌اند که Vps34 یک نقش اساسی در شروع

اتوفاژی در مخمر و ارگانیسم‌های پیشرفته‌تر بازی می‌کند. Vps34 در دو کمپلکس بزرگ ایفای نقش

می‌کند. در کمپلکس اول UVRAG و Atg14L درگیر می‌شوند و این کمپلکس در القای اتوفاژی دخیل است (۵۵).

Beclin1 نیز یک پروتئین اتوفاژی در پستانداران است که این نقش را به عنوان بخشی از کمپلکس اصلی که محتوی Vps34 است انجام می‌دهد (۱۶).

به استثنای دو مطالعه که یک ارتباط بین جهش پروموتر hVps34 (همولوگ Vps34 در انسان) و شیذوفرنی را نشان می‌دهد، جهش یا تغییرات مرتبط با بیماری در بیان hVps34 در انسان‌ها تشخیص داده نشده است. با این وجود، hVps34 قویاً در تعدادی از پروسه‌های سلولی درگیر در بیماری‌های انسان شرکت دارد که می‌تواند hVps34 را به عنوان یک هدف در فارماکولوژی بسازد. hVps34 یکی از تنظیم‌کننده‌های مهم اتوفاژی است که نقش آن در سیستم ایمنی، پاک‌سازی تجمعات پروتئینی پاتولوژیکال در بیماری نورودژنراتیو و ساپرس تومور اثبات شده است. برای مثال، تنظیم افزایشی اتوفاژی با توقف mTOR، توکسیسیته را در یک مدل بیماری هانتینگتون کاهش می‌دهد، در حالی که توقف اتوفاژی با از بین بردن Atg7 در سلول‌های پورکنژ منجر به نورودژنراسیون می‌شود. به طور مشابه، خراب کردن Beclin1 یا Vps34، پاک‌سازی ناشی از تحریک IGF-1<sup>۲۲</sup> در مورد تجمعات هانتینگتین جهش یافته در سلول‌های HeLa را بلوکه می‌کند. اگر تنظیم افزایشی فارماکولوژیکال hVps34 منجر به تقویت اتوفاژی می‌شود، پس ممکن است یک روش درمانی برای اختلالات نورودژنراتیو باشد (۵۲).

---

<sup>22</sup> insulin-like growth factor1

Sarah f و همکاران بیان کرده‌اند که Atg14L منجر به تقویت فعالیت Vps34 lipid kinase می‌شود

که برای تشکیل اتوفاگوزوم ضروری است. این تاثیر Atg14L بر روی فعالیت Vps34 kinase بستگی به

بیان هم‌زمان Beclin1 دارد (۱۶).

Evangelia Kesidou و همکاران در سال ۲۰۱۳ بیان کرده‌اند که بر طبق مطالعات اخیر کاهش

بیان ژن Beclin1 منجر به آسیب اتوفاژی در نورون‌ها و نورودژنراسیون می‌شود (۲۲).

Hironori Suzuki و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داده‌اند که Atg13 و پروتئین‌های LC3 برای

تشکیل اتوفاگوزوم ضروری هستند. هر یک از ایزوفرم‌های انسانی LC3 با Atg13 از طریق ناحیه

برهم‌کنشی LC3 در Atg13 (LIR) برهم‌کنش می‌کنند که برای تشکیل صحیح اتوفاگوزوم نیاز است

(۵۶).

آمینو اسید ۱۱۲ تا ۲۲۰ Atg13 مستقیماً با Atg101 برهم‌کنش می‌کند. برهم‌کنش بین Atg101 و

Atg13 می‌تواند برای پایداری و فسفریلاسیون پایه‌ی Atg13 و ULK1 مهم باشد (۱۹). Atg13 فعالیت

Atg1 را تنظیم می‌کند. در طول محرومیت غذایی یا استرس با غیر فعال شدن mTOR،

هایپر فسفریلاسیون Atg13 و تحریک کمپلکس Atg1-Atg13 اتفاق می‌افتد که برای القای اتوفاژی نیاز

است (۳۸).

# فصل سوم

## مواد و روش‌ها

## روش کار

### ۳-۱- ابزار و مواد

موش صحرایی نر ، دستگاه استریوتاکس، استوانه شیشه‌ای به ابعاد قطر=۳۳ سانتیمتر، ارتفاع=۲۵ سانتیمتر، دریل مخصوص، سرنگ همپلتون ۵ میکرولیتری، ست جراحی، پنبه، گاز و نخ بخیه، ذره بین، تیغ معمولی، تیغ بیستوری، سرنگ انسولین، ترازوی دیجیتالی، رک سر سمپلر، سر سمپلر زرد و آبی و کریستالی، میکروتیوب ۱/۵ میلی، میکروتیوب ۰/۵ میلی، میکروتیوب ۰/۲ دستگاه ترمو بلاک، دستگاه ترمو سایکلر، سانتریفیوژ، دستگاه نانو دراپ.

نوروتوکسین 6-OHDA، آپومورفین، الکل ۷۰ درصد، پودر اسید اسکوربیک، کتامین، گزیلازین،

بتادین، نرمال سالین، water nuclease free، DEPC، کیت استخراج RNA، کیت سنتز cDNA،

Gene Ruler 100bp DNA Ladder، Taq Master mix red، محلول ETA، ژل آگارز، پرایمر، DNase 1،

Superior Gel Red.

### ۳-۲- گروه‌های مورد مطالعه

برای انجام مطالعات بافتی و رفتاری جسم سیاه در مدل تجربی پارکینسون از ۳۰ سر موش صحرایی

نر نژاد ویستار (wistar) به وزن ۲۰۰-۳۰۰ گرم که از پژوهشکده‌ی رازی (کرج) تهیه شد، استفاده گردید.

حیوانات بر طبق پروتوکل کار با حیوانات دانشگاه علوم پزشکی قزوین، در گروه‌های ۴ تایی در قفس با

دمای محیط ۲۷-۲۳ درجه سانتی گراد و شرایط نور و تاریکی یکسان در ۲۴ ساعت نگه داری شده و بدون محدودیت به آب و غذای مخصوص دسترسی داشته و برای سازگاری با محیط یک ماه قبل به حیوان خانه انتقال داده شدند.

حیوانات بصورت تصادفی به ۳ گروه زیر دسته‌بندی می‌شوند:

الف- تخریب (lesion - group) (تزریق سم 6-OHDA به درون استریاتوم)

ب- شاهد (تزریق سالیین آسکوربات به استریاتوم) (SHAM Operated Groop)

ج- کنترل (بدون تزریق)

### ۳-۳- ارزیابی رفتاری قبل از جراحی

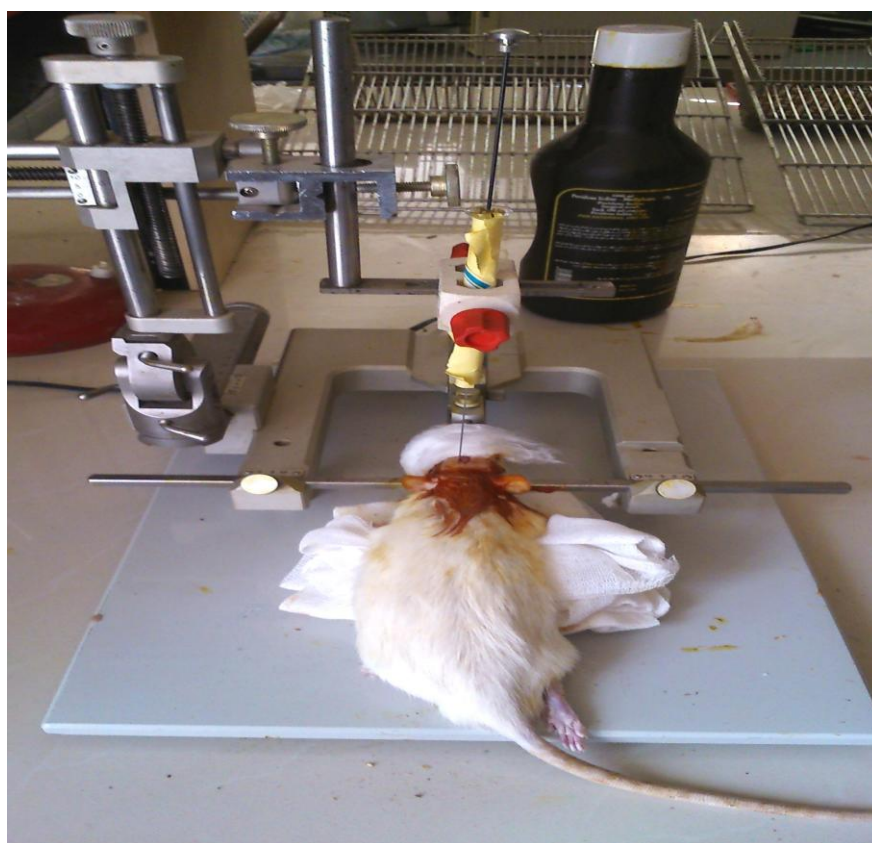
از داروی آپومورفین هیدروکلراید (شرکت sigma) به میزان ۰/۵ mg/kg برای بررسی رفتاری قبل از انجام جراحی استفاده شد. آپومورفین به صورت پودر است که در محلول نرمال سالیین ۰/۹ درصد به میزان ۰/۳ CC حل شد. سپس یک هفته قبل از جراحی با سرنگ انسولین به صورت داخل صفاقی به موش‌ها تزریق شد. البته موش‌ها ۱۰ دقیقه قبل از انجام آزمایش در محفظه استوانه ای مدرج با ابعاد قطر ۳۴ و ارتفاع ۳۷ سانتی متر و شفاف از جنس پلاستیک نگه داری شدند. ۵ دقیقه بعد از تزریق دارو به مدت یک ساعت تعداد چرخش‌های کامل ۳۶۰ درجه در مقاطع زمانی ۱۰ دقیقه ای به شکل دستی حساب شد. مقدار چرخش موش‌ها به سمت راست یعنی در جهت خلاف محل ضایعه به عنوان عدد

مثبت و مقدار چرخش آنها به سمت چپ یعنی هم جهت با محل ضایعه به عنوان عدد منفی در نظر گرفته شد. سپس مقدار چرخش در دو جهت تفریق شد و میزان چرخش اصلی به دست آمد. در هفته قبل از جراحی، موش‌های با چرخش بیشتر از ده دور کامل  $360^\circ$  درجه در  $60$  دقیقه به دنبال تجویز داخل صفاقی آپومورفین هیدروکلراید با دوز  $0.5 \text{ mg/kg}$  از آزمایش حذف شدند. بررسی رفتاری با آپومورفین مجدداً چهار هفته بعد از جراحی و ایجاد ضایعه برای هر موش تکرار شد. آنالیز رفتاری پس از محاسبه قبل و بعد از جراحی بررسی شد ( $60$  و  $59$  و  $58$  و  $57$ ).

### ۳-۴- جراحی

بیهوشی موش‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین و گریلازین به ترتیب  $100$  و  $5$  میلی‌گرم در هر کیلوگرم انجام گرفت، سپس موش‌ها در دستگاه استریو تاکس قرار گرفتند. مختصات دستگاه برای تزریق در ناحیه‌ی استریاتوم بر روی  $3$  میلی متر لترال به سمت چپ،  $4/5$  میلی متر شکمی از سطح سخت شامه و  $9/2 +$  میلی متر قدامی خلفی نسبت به فاصله بین دو گوش (interaural) تنظیم شد. میله دندان‌ی (incisor bar)  $3/3$  میلی‌متر زیر سطح افق قرار گرفت. در موش برای یافتن مختصات محل تزریق از اطلس (paxinos & Watson) استفاده شد ( $62$  و  $61$  و  $60$  و  $5$ ). پس از فیکس کردن سر حیوان در دستگاه، با تیغ معمولی کرک‌های سر حیوان پاک شد تا پوست در معرض دید قرار گیرد، پس از ضد عفونی کردن محل جراحی با بتادین، به وسیله تیغ جراحی شکافی موازی با سطح ساژیتال از محل فاصله بین چشم‌ها

تا ناحیه فاصله بین گوش‌ها ایجاد شد و پس از پیدا کردن مختصات، استخوان محل تزریق توسط دریل مخصوص با سرعت پایین سوراخ شد. با دیدن سطح سخت شامه، تزریق با سرنگ همیلتون ۵ یا ۱۰ میکرولیتری صورت گرفت. سرعت تزریق به داخل استریاتوم به میزان یک میکرولیتر در دقیقه است و ۵ دقیقه پس از تزریق سرنگ به آهستگی خارج می‌شود تا نوروتوکسین به آرامی جذب شود و ماده‌ی تزریق شده به بیرون نریزد. در مدت جراحی برای جلوگیری از خشک شدگی و آسیب، چشمان حیوان با پارچه‌ی نم‌دار مرطوب نگاه داشته شد (شکل ۳-۱).



شکل ۳-۱: موش‌ها را پس از بیهوش شدن در دستگاه استرئوتاکسی قرار می‌دهیم. محل تزریق را با مته سوراخ

کرده و سپس با سرنگ همیلتون سم 6-OHDA به ناحیه‌ی استریاتوم چپ تزریق می‌کنیم.



ماده تزریق شده در گروه‌های مختلف متفاوت است:

الف- در استریاتوم چپ حیوانات گروه تخریب (شکل ۳-۱ و ۳-۲)، ۵ میکرولیتر از محلول نرمال سالین

۰/۹٪ حاوی ۲/۵ میکروگرم بر میکرولیتر از نوروتوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین هیدروکلراید

(Sigma USA) و اسید اسکوربیک ۰/۲٪ تزریق شد.

ب- در استریاتوم چپ حیوانات گروه شاهد ۵ میکرولیتر محلول نرمال سالین ۰/۹٪ حاوی اسید اسکوربیک

۰/۲٪ تزریق شد.

پس از پایان تزریق محل جراحی بخیه شد و برای جلوگیری از عفونت پماد تتراسایکلین بر روی

محل بخیه زده شد و سپس موش‌ها به محل گرم منتقل شدند. زیرا دمای بدن موش‌ها به علت جراحی به

میزان زیادی پایین می‌آید (۶۲ و ۶۰).

### ۳-۵- بیهوشی

برای تهیه داروی بیهوشی از مخلوط کتامین ۱۰۰ mg/kg و گزیزلین ۵ mg/kg استفاده می‌شود. برای

مثال، برای موش صحرایی ۲۰۰ گرمی از ویال کتامین ۱۰٪ که محتوی ۱۰۰ میلی‌گرم کتامین در هر سی

سی است، به میزان ۰/۲ سی سی که معادل ۲ واحد سرنگ انسولین است کشیده می‌شود. گزیلازین هم میزان آن یک بیستم مقدار کتامین است. به میزان ۰/۱ سی سی یا یک واحد سرنگ انسولین نیز کتامین کشیده می‌شود. در صورت به هوش آمدن می‌توان یک یا دو واحد دیگر از داروی بیهوشی کتامین به حیوان تزریق کرد.

### ۳-۶- بررسی بیان ژن به وسیله واکنش پلیمرز معکوس (RT-PCR)

برای بررسی بیان ژن‌های FoxO3a، LC3، Atg13، Atg14L، Atg101، VPS34 و GAPDH از

تکنیک RT-PCR استفاده شد. از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

۱. بررسی در جسم سیاه موش‌های گروه کنترل (بدون تزریق)

۲. بررسی در جسم سیاه گروه تخریب

۳. بررسی در جسم سیاه گروه شاهد

برای انجام RT-PCR ابتدا پرایمرهای مورد نیاز توسط نرم افزار Gene Runner طراحی گردید و

سپس از شرکت ژن فناوران تهیه گردید. در طراحی پرایمر از پرایمرهایی با طول ۱۸-۲۱ نوکلئوتید و

ترکیب نوکلئوتیدی با الگوی ۵۰-۶۰ درصد GC و ۴۰-۵۰ درصد AT استفاده گردید. باز انتهای ۳' از

انواع C، G، GC یا CG طراحی شد تا احتمال ایجاد سنجاق سر و دایمر پرایمر کاهش یابد. پرایمر

ژن‌های مورد نظر در جدول ۱-۳ نشان داده شده‌اند. در این تکنیک RNA کل از سلول‌های هر گروه به

وسیله کیت استخراج RNA (Roche Biochemicals, Germany) استخراج گردید. یکی از نکات مهم در بررسی بیان ژن به وسیله RT-PCR، عدم وجود DNA ژنومی در این واکنش است، زیرا این نوع DNA می‌تواند در واکنش PCR به عنوان الگو عمل کرده و باعث ایجاد نتایج کاذب شود. به این منظور حذف DNA ناخواسته با استفاده از کیت DNase I (fermentas) صورت گرفت. سپس RNA با استفاده از کیت تولید cDNA (Thermo Scientific) و آنزیم کپی برداری معکوس به DNA مکمل (cDNA) تبدیل شد. سپس cDNA حاصله به روش PCR تکثیر شده، مورد بررسی قرار گرفت.

Gene	Primer(5'--> 3')	Sequence size
<b>FoxO3a</b>	F: GTCCATCATCCGTAGCGAAC R: TTTTCTCTGTAGGTCTTCCGGTC	216bp
<b>Atg101</b>	TGGGATCTCAGGGTTCTTG AACCAAGACAAACTCACACC	227bp
<b>Atg13</b>	ACTCTCCCTCCCTCCTTTCTC TACAGCCTTTGGGAGATGATG	198bp
<b>VPS34</b>	ACAGGCAAACCTTTCCATATAG CATCAACCATCAAGGAGAAC	218bp
<b>ATG14L</b>	TTGTCACCGTATCTTCCTGTTG CCAGCCGTCCGTCTCCTC	203bp
<b>LC3</b>	TGTTAGGCTTGCTCTTTTGG GCAGAGGAAATGACCACAGAT	219bp
<b>GAPDH</b>	ATCTGACATGCCGCCTGGAG AAGGTGGAAGAATGGGAGTTGC	154 bp

جدول ۳-۱: پرایمرهای Forward (F) و Reverse (R) استفاده شده در RT-PCR

### ۳-۶-۱- استخراج RNA

استخراج RNA از بافت‌ها چهار مرحله اساسی دارد:

تخریب کامل بافت

دناتوره کردن کمپلکس‌های پروتئینی

غیرفعال کردن ریبونوکلیئازهای داخل سلول

### ۳-۶-۱-۱- تخلیص RNA

قبل از استخراج RNA باید به نکات زیر توجه کرد:

(۱) RNA بسیار حساس و ناپایدار است و آنزیم RNase موجود بر روی وسایل و محیط کار RNA را از بین می‌برد.

(۲) ماده‌ای به نام DEPC (Roth) ۰/۱٪ فعالیت آنزیم RNase را متوقف می‌کند.

محلول آبی ۰/۱٪ DEPC (Roth) را آماده و ظروف، سرسمپلرها و میکروتیوب‌ها در این آب قرار داده

شد. سپس به مدت یک شبانه روز در دمای محیط انکوبه گردید. در مرحله بعد، به مدت ۳۰ دقیقه با

دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد اتوکلاو شد و آب آن‌ها خالی شد و مجدداً با همان شرایط، اتوکلاو گردید و

پس از خشک شدن، مورد استفاده قرار گرفت. به هنگام کار باید حتماً از دستکش استفاده شود و کل

فرآیند در زیر هود انجام گردید. از لوازم یک بار مصرف عاری از RNase استفاده شد.

### ۳-۶-۱-۲- مراحل استخراج RNA

(۱) ۴۰۰ میکرولیتر از بافر lysis/binding بر روی یک میلیون رسوب سلول ریخته و مخلوط شد و در

ستون مخصوص ریخته شد.

(۲) سپس این مخلوط به مدت ۱۵ ثانیه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با دور ۸۰۰۰ g سانتریفوژ شد.

سپس میکروتیوب زیر ستون و هر چه که در آن بود دور ریخته شد و میکروتیوب دیگری به جای آن قرار داده شد.

(۳) به ستون به میزان ۹۰ لاندا از DNase incubation buffer و 10 لاندا محلول DNase I اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۵-۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

(۴) ۵۰۰ لاندا بافر wash buffer I به ستون اضافه شد و به مدت ۱۵ ثانیه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و در دور ۸۰۰۰ g سانتریفوژ گردید، سپس میکروتیوب زیر ستون با میکروتیوب دیگر جا به جا شد.

(۵) به مقدار ۵۰۰  $\mu$ l بافر wash buffer II به ستون اضافه گردید و به مدت ۱۵ ثانیه در دمای ۴ درجه

سانتی گراد و در دور ۸۰۰۰ g سانتریفوژ شد. سپس میکروتیوب زیر ستون با میکروتیوب دیگر جایگزین شد.

(۶) ۲۰۰  $\mu$ l بافر wash buffer II به ستون اضافه گردید و به مدت دو دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی

گراد و با دور ۱۳۰۰۰ g سانتریفوژ شد. سپس میکروتیوب زیر ستون با میکروتیوب دیگر جایگزین شد.

۷) سپس برای استخراج RNA یک میکروتیوب جدید در زیر ستون قرار داده شد و به میزان ۵۰

لاند از elution buffer در ستون ریخته شد و به مدت یک دقیقه در دور ۸۰۰۰ g سانتریفوژ شد. RNA

در میکروتیوب زیرین گردآوری شد.

### ۳-۶-۲- تعیین غلظت و خلوص RNA و DNA به روش اسپکتروفوتومتری

برای تعیین غلظت و خلوص نمونه‌های DNA و RNA از خاصیت جذب نوری استفاده می‌شود. به

این صورت که با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV، میزان جذب پرتوها در سه طول موج ۲۳۰،

۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده و نسبت‌های ۲۶۰/۲۳۰ و ۲۶۰/۲۸۰ حساب می‌شود. برای این کار از دستگاه

اسپکتروفوتومتر Nano Drop استفاده شد که این مقادیر را به صورت اتوماتیک محاسبه کرده و منحنی

آن‌ها را رسم می‌کند. ۲۶۰ نانومتر طول موجی است که اسیدهای نوکلئیک حد اکثر جذب را دارند. ۲۸۰

نانومتر برای تعیین غلظت پروتئین‌ها و ۲۳۰ نانومتر برای کربوهیدرات‌ها و برخی املاح به کار می‌رود.

جهت تعیین خلوص DNA و RNA مناسبترین نسبت ۲۶۰/۲۸۰ یک نمونه حدود ۱/۸ برای DNA و بالاتر

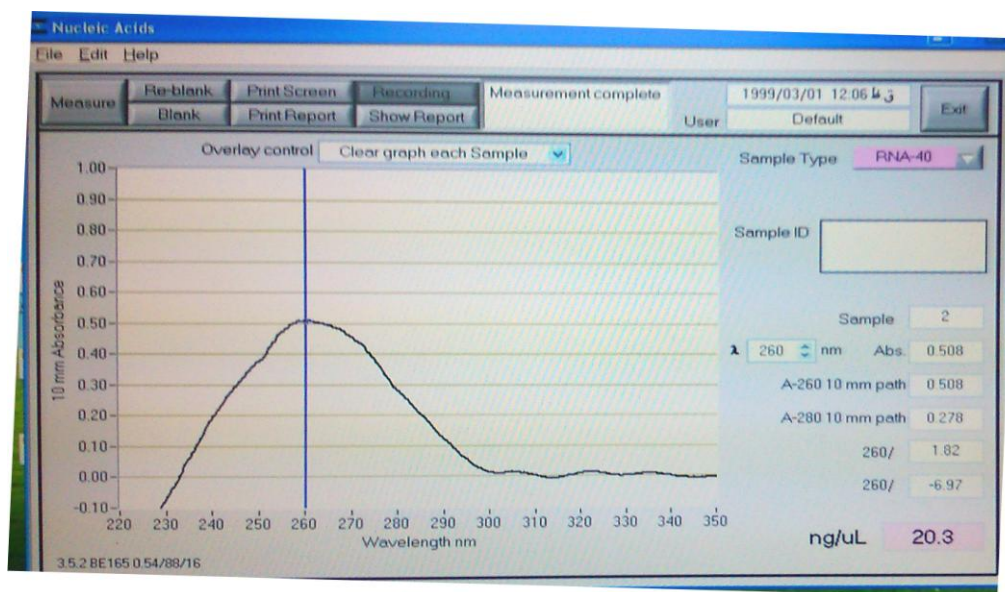
از ۱/۸ تا ۲ برای RNA می‌باشد. اگر این نسبت خیلی کمتر از این میزان باشد نشانگر غلظت‌های بالای

پروتئین یا فنول در محلول است. مناسب ترین نسبت ۲۶۰/۲۳۰ محلول در این حال بین ۲-۲/۲ است. در

صورتی که این میزان خیلی کم باشد می‌تواند نشان دهنده بالابودن میزان کربوهیدرات‌ها یا فنول یا

املاحی باشد که معمولا در بافرها استفاده می‌شوند. غلظت‌های DNA و RNA نیز در محلول توسط

همین دستگاه تعیین می شوند. نکته مهم آنست که غلظتی که توسط اسپکتروفوتومتر به عنوان غلظت DNA یا RNA خوانده می شود در واقع مجموعه ای از غلظت DNA دو رشته‌ای، DNA تک رشته‌ای، RNA و dNTP ها است، لذا همیشه میزان RNA یا DNA دو رشته‌ای محلول کمتر از آن چیزی است که توسط دستگاه خوانده می شود. با توجه به این موارد، میزان خلوص و غلظت RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. به این صورت که ابتدا یک لاندای آب مقطر برای صفر کردن دستگاه در محل مورد نظر ریخته و گزینه BLANK را می زنیم و سپس آب مقطر را کاملاً پاک کرده و یک لاندای از نمونه RNA را در همان محل ریخته و دوباره گزینه BLANK را می زنیم. همانطور که در شکل زیر مشاهده می‌شود، میزان خلوص آن طبق نسبت  $260/280$  برابر با  $1/82$  و غلظت آن  $20/3$  نانوگرم بود.



شکل ۳-۲: اندازه‌گیری میزان غلظت و خلوص RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ. همانطور که مشخص است، برای یک لاندای RNA نسبت  $260/280$  برابر با  $1/82$  و میزان غلظت برابر با  $20/3$  نانوگرم می‌باشد.

### ۳-۶-۳ حذف DNA از RNA استخراج شده

روش کار

برای هر چه بیشتر خالص شدن محلول از نظر داشتن RNA، تصمیم بر آن شد تا با استفاده از

کیت DNase 1، مقادیر جزئی از DNA باقی مانده را نیز از محلول RNA استخراج شده حذف شود. به

۵۰ میکرولیتر RNA تهیه شده (تقریباً ۱ میکرو گرم RNA)، ۱ میکرولیتر DNase I و ۱ میکرولیتر

10X reaction buffer with MgCl2 اضافه شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه

گردید. بعد از انکوباسیون، ۱ میکرولیتر 50mM EDTA اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه

سانتی گراد قرار گرفت.

نکته: RNA در غیاب عوامل جاذب مانند EDTA هیدرولیز می‌شود.

### ۳-۶-۴ واکنش پلی مرز معکوس

روش کار

(۱) در میکرو تیوب فاقد RNase، ۰/۱ میکرو گرم از RNA با ۱ میکرولیتر الیگو dT مخلوط شد و با

water nuclease free به حجم ۱۲ میکرولیتر رسانده شد.

(۲) مخلوط فوق در ۶۵ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه انکوبه شد و سپس فوراً بر روی یخ منتقل

شد تا ساختارهای ثانویه RNA از هم باز شده و فرصت کافی برای فولد شدن نداشته باشند.



۳) به مخلوط فوق بافر X ۵ به میزان ۴ میکرولیتر، dNTP (10 mM) به میزان ۲ میکرو لیتر و

Ribolock RNase inhibitor به میزان 1 میکرولیتر افزوده شد و ۱ میکرولیتر هم Revert Aid M-MuL V

Reverse Transcriptase اضافه شد و با هم مخلوط شد.

۴) مخلوط فوق به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

۵) این مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت که سبب غیرفعال شدن

آنزیم گردید، سپس بلافاصله به ظرف یخ منتقل شد. محصول cDNA به دست آمده در ۲۰- درجه سانتی

گراد ذخیره گردید.

### ۳-۶-۵- انجام PCR بر روی cDNA تهیه شده

روش کار

برای اطمینان از یکسان بودن همه‌ی ترکیبات در تمامی تیوب‌های PCR، در هر سری انجام واکنش،

یک محلول اصلی از تمام ترکیبات مورد استفاده در PCR به غیر از پرایمرها و cDNA به صورت زیر

(جدول ۳-۲) ساخته شد. مواد زیر برای واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر مناسب است.

ماده	حجم
DNA الگو (cDNA 1 µg/µl)	1 میکرولیتر به ازاء هر تیوب
پرایمر فوروارد	۰/۵ میکرولیتر به ازاء هر تیوب
پرایمر ریورز	۰/۵ میکرولیتر به ازاء هر تیوب
Taq Red 2x Applicon Master mix	۱۲/۵ میکرولیتر به ازاء هر تیوب

جدول ۳-۲: مواد مورد استفاده در واکنش PCR

– water nuclease free به میزانی که حجم هر تیوب در این مرحله به ۲۵ میکرولیتر برسد. سپس در

دستگاه Thermal cyclor قرار داده شد.

مراحل انجام واکنش در دستگاه Thermal cycle در جدول زیر نشان داده شده است (جدول ۳-۳):

مراحل	دما (°C)	زمان	تعداد سیکل
واسرشتگی اولیه	95	۵ دقیقه	۱
واسرشتگی	95	25 ثانیه	۳۵
جفت شدن شیب دمایی	55	20 ثانیه	۳۵
کشیدگی	۷۲	45 ثانیه	۳۵
کشیدگی نهایی	۷۲	7 دقیقه	۱

جدول ۳-۳: مراحل انجام واکنش PCR

در هر بار انجام PCR یک کنترل داخلی و یک نمونه شاهد نیز به کار گرفته شد. در تیوب شاهد به

جای cDNA، 1 میکرولیتر آب اضافه شد تا از عدم آلودگی نمونه‌ها اطمینان حاصل شود. پس از پایان

PCR، به میزان حدوداً ۶ لانداز محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (Invitrogen) الکتروفورز

شد و بقیه محصول PCR در دمای ۲۰°C- نگه داری شد.

### ۳-۶-۶- بررسی محصول PCR در ژل آگاروز

قطعات DNA به دلیل داشتن بار منفی تحت جریان الکتریکی از قطب منفی به سمت قطب مثبت حرکت می کنند. قطعات DNA در ژل آگاروز بر مبنای وزن، اندازه و شکل فضایی از هم جدا می شوند. در این آزمایش از ژل آگاروز ۱/۵ درصد، استفاده شد. هرچه اندازه ی DNA بزرگتر باشد درصد ژل کمتر خواهد شد.

#### روش کار

۱) ۰/۷۵ گرم پودر آگاروز در ۵۰ میلی لیتر بافر TAE<sup>۱</sup> X (برای قطعات بیش از ۱۰۰۰ باز) با حرارت مایکرو ویو کاملاً حل شد تا شفاف گردید.

۲) بعد از سرد شدن (دمای ۶۰ درجه سانتی گراد)، سینی مخصوص ژل با شانه‌ی مناسب آماده شد و ژل به ضخامت ۵ میلی متر به آن اضافه شد و سپس در دمای اتاق به ژل زمان داده شد تا کاملاً سفت شود.

۳) پس از بستن ژل، شانه از آن خارج شد و ژل در درون تانک الکتروفورز حاوی بافر TAE 1X قرار داده شد.

۴) مقدار ۶ میکرولیتر از نمونه DNA خالص شده با ۱ میکرولیتر بافر نمونه گذاری (Fermentas) خوب مخلوط شد و به درون چاهک ژل منتقل گردید.

با توجه به اینکه به ازای هر سانتی متر ژل ۱۰-۵ ولت در نظر گرفته می شود، نمونه ها با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شدند. هنگامی که خط رنگ محلول نمونه گذاری دو سوم طول ژل را پیمود، دستگاه را خاموش کرده و ژل از تانک خارج شد و در دستگاه Gel Documentation (Uvtec D55, France)، با استفاده از طول موج کوتاه UV بررسی شد.

### ۳-۷- آنالیز آماری

تمامی داده ها بصورت SEM Mean بیان شدند، در مورد نتایج حاصل از بررسی رفتار چرخش القا شده توسط آپومورفین در دو دوره بررسی هفته قبل و چهار هفته بعد از جراحی از آنالیز واریانس یکطرفه (one way ANOVA) و در صورت اختلاف معنی دار از آزمون پارامتریک Tukey و در مورد تغییرات رفتار چرخش در طی هفته چهارم در هر گروه نسبت به قبل از جراحی از آزمون paired t-test جهت مقایسه استفاده شد. جهت رسم نمودار ۴ از برنامه Microsoft Excel 2010 استفاده شد. در مورد کلیه یافته ها اختلاف در سطح  $p < 0/05$  به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

## فصل چہارم

### نتائج

## نتایج

در این فصل به نتایج حاصل از تزریق یکطرفه‌ی 6-hydroxy dopamine و سالی‌ن آسکورات به درون استریاتوم چپ موش‌ها و همچنین نتایج حاصل از RT-PCR بر روی ناحیه‌ی جسم سیاه چپ در سه گروه کنترل، شاهد و تخریب اشاره می‌گردد.

در این پژوهش برای اطمینان از تاثیر سم 6-hydroxy dopamine جهت ایجاد مدل پارکینسونی یکطرفه‌ی موش‌ها از تست رفتاری استفاده شد. بدین منظور، رفتار چرخشی حیوان (تعداد دفعات چرخش در طی یک ساعت) به دنبال تزریق داخل صفاقی آپومورفین هیدروکلراید بررسی شد. این تست رفتاری در مورد هر سه گروه اجرا شد.

### ۴-۱ بررسی رفتار چرخشی

در این قسمت در تمام گروه‌ها تعداد دفعات چرخش القا شده به دنبال تزریق آپومورفین یک هفته قبل از جراحی (base line) و چهار هفته پس از جراحی مورد ارزیابی قرار گرفت. در بررسی میانگین تعداد دفعات چرخش القا شده به دنبال تزریق داخل صفاقی داروی آپومورفین یک هفته قبل از جراحی همان‌گونه که در جدول و شکل ۴-۱ مشاهده می‌شود، هیچگونه اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها مشاهده نشد. موش‌های گروه تخریب، پس از ۴ هفته، به دنبال تزریق آپومورفین میانگین تعداد چرخش کونترول‌ترال معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) نسبت به هفته‌ی قبل از جراحی نشان دادند. هر یک از دو گروه کنترل

بدون تزریق و گروه شاهد با تزریق سالین آسکوربات هیچ اختلاف معنی‌داری را در میانگین تعداد چرخش

کونترولترال در هفته‌ی چهارم پس از جراحی نسبت به هفته‌ی قبل از جراحی نشان ندادند (جدول و

شکل ۴-۱).



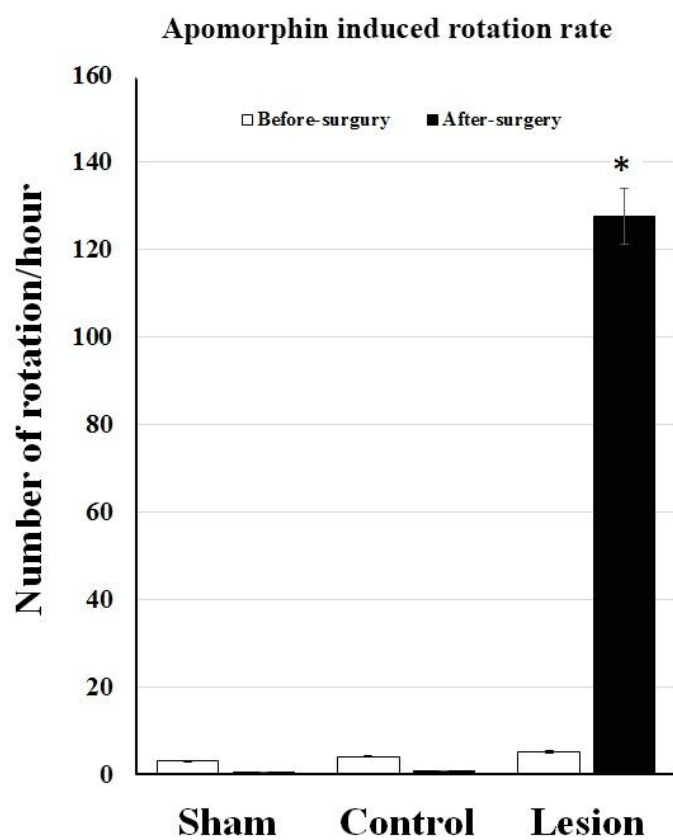
### میانگین تعداد کل چرخش کونترولترال القا شده بر اثر آپومورفین

میانگین تعداد کل چرخش کونترولترال			
هفته	کنترل	شاهد	تخریب
۰	۴	۳	۵
۴	۰.۷۱۴۲۸۶	۰.۴۲۸۵۷۱	*۱۲۷.۷۵

**جدول ۴-۱:** جدول میانگین تعداد کل دفعات چرخش به سمت راست ( $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ ) را در یک ساعت بر اثر تزریق

داخل صفاقی آپومورفین ( $0.5 \text{ mg/kg}$ ) یک هفته قبل از جراحی و چهار هفته پس از جراحی نشان می‌دهد. در مورد کلیه

یافته‌ها اختلاف در سطح  $p < 0.05$  به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.



شکل ۴-۱: نمودار میانگین تعداد چرخش کونترولترال القا شده توسط داروی آپومورفین هیدروکلراید را در سه گروه کنترل، شاهد و تخریب یک هفته قبل از جراحی و چهار هفته پس از جراحی نشان می‌دهد. گروه تخریب اختلاف معنی داری را در هفته‌ی چهارم پس از جراحی نسبت به هفته‌ی قبل از جراحی نشان دادند.

\*  $P < 0.05$

Control: گروه کنترل

Sham: گروه شاهد

Lesion: گروه تخریب

## ۲-۴- بررسی بیان ژن‌ها به روش RT-PCR

در این قسمت در تمامی گروه‌ها برای بررسی بیان و یا عدم بیان ژن‌های FoxO3a، LC3، Atg13،

Atg14L، Atg101 و VPS34 از تکنیک RT-PCR بر روی جسم سیاه سمت چپ استفاده شد. از این

روش به منظور بررسی اختلاف مرحله‌ی القا و nucleation در فرایند اتوفاژی در جسم سیاه تخریب شده

در موش‌های پارکینسونی در مقایسه با موش‌های گروه کنترل و شاهد استفاده شد. از ژن GAPDH به

عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

در بررسی بیان ژن‌های FoxO3a، LC3، Atg13، Atg14L، Atg101، VPS34 و GAPDH در مدل

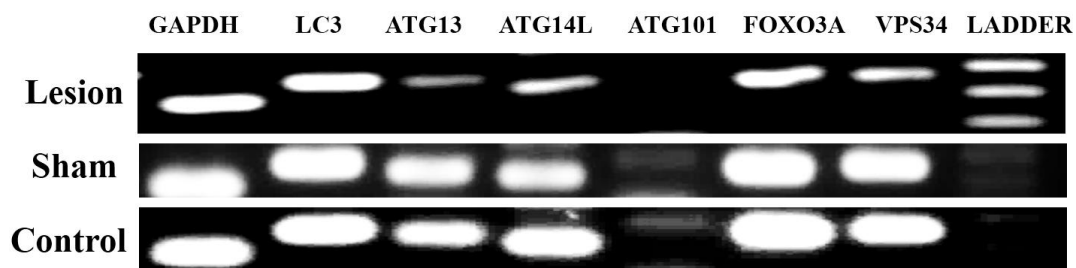
بیماری پارکینسون موش صحرایی و نیز در گروه کنترل و شاهد به روش RT-PCR مشاهده شد که

ژن‌های FoxO3a، LC3، Atg13، Atg14L، VPS34 و GAPDH در مدل بیماری پارکینسون بیان شدند،

اما ژن Atg101 بیان نشد. در گروه‌های کنترل و شاهد تمامی ژن‌ها بیان شدند (شکل ۲-۴). همچنین

داده‌های شبه کمی حاصله از نرم‌افزار Image J تنظیم کاهشی ژن‌های FoxO3a، VPS34، Atg13 و

Atg14L را در موش‌های پارکینسونی نشان داد (شکل ۳-۴).

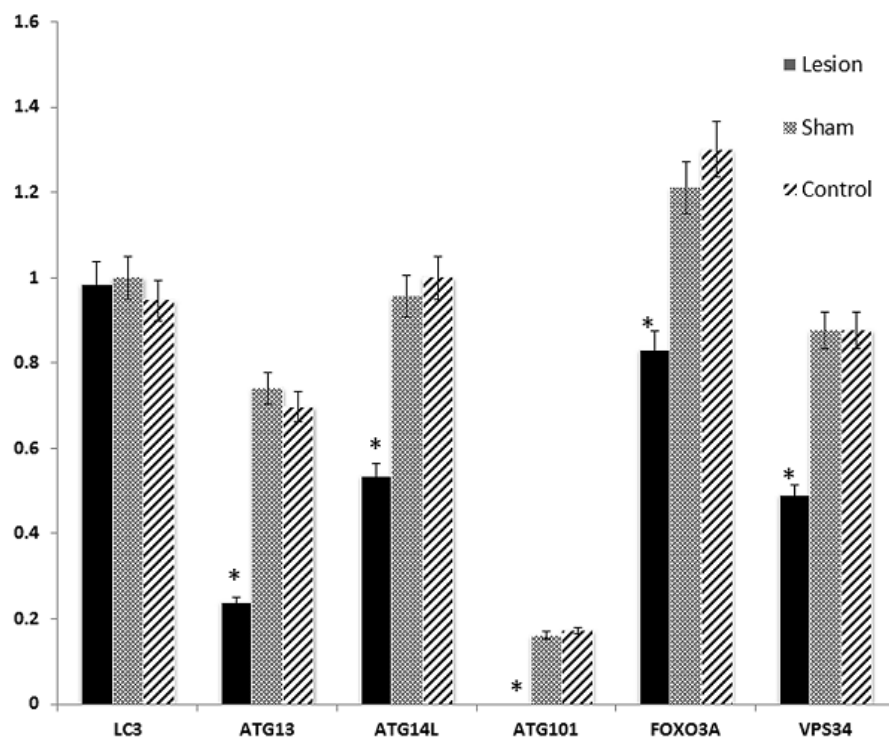


شکل ۴-۲: تصویر بیان و یا عدم بیان ژن‌های FoxO3a, LC3, Atg13, Atg14L, Atg101, VPS34 و GAPDH را در مدل بیماری پارکینسون موش صحرایی و نیز در گروه‌های کنترل و شاهد به روش RT-PCR نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود در گروه تخریب ژن‌های FoxO3a, LC3, Atg13, Atg14L و VPS34 و GAPDH بیان شدند اما ژن Atg101 بیان نشده است. در گروه کنترل و شاهد تمام ژن‌ها بیان شده‌اند. از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است.

Control: گروه کنترل

Sham: گروه شاهد

Lesion: گروه تخریب



شکل ۴-۳: داده‌های شبه کمی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Image J از ژل تنظیم کاهشی ژن‌های FoxO3a، VPS34، Atg13 و Atg14L را در موش‌های پارکینسونی نشان می‌دهد. محور عمودی نشان‌دهنده میزان بیان ژن‌ها می‌باشد.

Control: گروه کنترل

Sham: گروه شاهد

Lesion: گروه تخریب

## فصل پنجم

### بحث و نتیجه گیری

## ۵-۱- بحث

در این پژوهش، در آزمون چرخش القا شده توسط آپومورفین به دنبال تزریق داخل صفاقی آپومورفین، موش‌های گروه تخریب پس از چهار هفته چرخش به سمت راست معنی دار نسبت به هفته‌ی قبل از جراحی نشان دادند. در بررسی بیان ژن‌های FoxO3a، LC3، Atg13، Atg14L و Atg101 و VPS34 به روش RT-PCR مشاهده شد که ژن‌های FoxO3a، LC3، Atg13 و VPS34 و Atg14L در مدل پارکینسون بیان شدند، اما ژن Atg101 بیان نشد. در گروه‌های کنترل و شاهد تمامی ژن‌ها بیان شدند. تنظیم کاهشی ژن‌های FoxO3a، Atg13، VPS34 و Atg14L در گروه تخریب مشاهده شد.

بیماری پارکینسون یک بیماری نورودژنراتیو است که با تخریب وسیع نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه همراه است (۱ و ۲). پیشرفت‌های زیادی در جهت فهم پاتوژن‌های بیماری پارکینسون در طول دو دهه‌ی گذشته ایجاد شده است که عمدتاً نتیجه‌اش کشف جهش‌های ژنی خاص بوده است که در آغاز پارکینسون شرکت می‌کنند. اخیراً فقدان تنظیم مسیر اتوفاژی در مغز بیماران پارکینسون و مدل‌های حیوانی پارکینسون مشاهده شده است که به نقش اتوفاژی در این بیماری دلالت دارد. به راستی، اتوفاژی در تعدادی از پاتوفیزیولوژی‌ها شامل انواع بیماری‌های نورودژنراتیو درگیر است. پاتوژن‌های این بیماری مربوط به استرس اکسیداتیو، نقص عملکرد میتوکندری و تجمع پروتئین است که همه با اتوفاژی مرتبط

هستند (۱). ژن‌های FoxO3a، LC3، Atg13، Atg14L، Atg101 و VPS34 در اتوفازی درگیر هستند پس می‌توانند با PD در ارتباط باشند (۲۴ و ۲۳ و ۲۲ و ۲۱ و ۱۴ و ۱۱).

برای ایجاد مدل بیماری پارکینسون در سال‌های اخیر از سم 6-OHDA استفاده می‌شود که به صورت داخل استریاتال تزریق می‌شود. در اواسط سال ۱۹۹۰، یک روش برای تزریق 6-OHDA ارائه شد که در آن این سم به درون استریاتوم تزریق شد. این تزریق یک آسیب فوری به ترمینال‌های استریاتال القا می‌کند و به دنبال آن فقدان نورون‌های بخش متراکم جسم سیاه به صورت پیشرونده و تاخیری و به صورت رتروگرا د رخ می‌دهد. درجه‌ی آسیب به بخش متراکم جسم سیاه در این روش در مقایسه با روش‌های دیگر کمتر است و در حدود سه تا چهار هفته طول می‌کشد تا مقدار کافی از نورون‌های بخش متراکم جسم سیاه تخریب شوند. این مدل به مدل انسانی پارکینسون که در آن تخریب نورونی به صورت تدریجی رخ می‌دهد شباهت بیشتری دارد (۶۳ و ۵).

مکانیسم عمل 6-OHDA اساساً مربوط به نقش پرو اکسیدانی آن است. در ابتدا در نورون، 6-OHDA در سیتوزول تجمع می‌یابد و اتواکسیداسیون سریع را پیش می‌برد و منجر به تشکیل میزان زیادی هیدروژن پراکسید می‌شود. 6-OHDA همچنین می‌تواند در میتوکندری تجمع یابد و فعالیت کمپلکس I را متوقف کند. در تحقیق حاضر به میزان ۱۲/۵ میکروگرم از سم 6-OHDA در ۵ میکرولیتر محلول سالین آسکوربات به صورت تزریق داخل استریاتال در سمت چپ برای ایجاد مدل بیماری پارکینسون بر روی



موش‌ها انجام شد که در این صورت نورون‌های دوپامینژیک بخش متراکم جسم سیاه به صورت ناقص از بین می‌روند که بسیار شبیه به شروع بیماری پارکینسون در انسان است (۵).

Xi Lu و همکاران در سال ۲۰۱۴ بیان کرده‌اند که 6-OHDA منجر به آسیب میتوکندری می‌شود و میتوکندری آسیب‌دیده می‌تواند مضر باشد و بنابراین باید توسط فرایند میتوفاژی نابود شود. پاک‌سازی موفق میتوکندری آسیب‌دیده برای حفظ سلامت نورون‌ها ضروری است. این دانشمندان ثابت کردند که 6-OHDA اتوفاژی را در مدل‌های پارکینسونی رت القا می‌کند (۶۳).

در مطالعه‌ای دیگر برای اثبات نقش اتوفاژی در مرگ نورون‌ها که با تزریق یک‌طرفه 6-OHDA به بخش متراکم جسم سیاه در مدل پارکینسونی رت القا شده بود، دانشمندان با روش میکروسکوپ الکترونی گذاره<sup>۲۳</sup> (TEM)، اتوفاگوزوم‌ها را ۶-۲۴ ساعت پس از تزریق سم در هر دو بخش متراکم جسم سیاه راست و چپ مشاهده کردند و نیز افزایش بیان پروتئین مارکر اتوفاژی LC3 به روش ایمونوفلوئورسنس در نورون‌های آسیب‌دیده‌ی مثبت از نظر تیروزین هیدروکسیلاز مشاهده شد (۶۵). با توجه به این موارد می‌توان بیان کرد که افزایش اتوفاگوزوم‌ها و فعال شدن اتوفاژی می‌تواند نقشی در مرگ نورون‌های دوپامینژیک القا شده توسط 6-OHDA بازی کند و بنابراین با روش تزریق یک‌طرفه این سم به استریاتوم نیز می‌توان فرایند اتوفاژی را بررسی کرد.

## رفتار حرکتی چرخشی

---

<sup>23</sup> Transmission Electron Microscopy

آسیب یکطرفه‌ی ایجاد شده توسط 6-OHDA می‌تواند رفتار چرخشی ایجاد کند، در پاسخ به داروهایی که قادر به تحریک گیرنده‌های دوپامین استریاتوم هستند، هم به شکل مستقیم مثل آپومورفین و هم به شکل غیر مستقیم مثل آفتامین که رها سازی دوپامین از ترمینال‌های استریاتال را در نیمکره‌ی سالم مغز تحریک می‌کنند. در مورد آپومورفین، حیوانات در جهت مخالف محل آسیب خواهند چرخید (۵). با تزریق یکطرفه‌ی 6-OHDA به درون استریاتوم موش صحرایی، بخش زیادی از نورون‌های دوپامینرژیک تخریب می‌شوند و سطح دوپامین در استریاتوم همان طرف کاهش می‌یابد. بعد از تزریق یکطرفه، موش‌ها برای مدت کوتاهی یک عدم تقارن حرکتی خود به خودی (چرخش به همان طرف) را نشان خواهند داد، اما به زودی این عدم تقارن از بین می‌رود مگر آن که یک محرک فیزیکی به حیوان وارد شود. با تجویز سیستمیک آگونیست‌های دوپامینرژیک مانند آپومورفین، یک رفتار حرکتی چرخشی در حیوان آشکار می‌شود (۴۲ و ۴۱ و ۴۰ و ۳۹).

با تخریب سمت چپ سیستم دوپامینرژیک نیگرا استریاتال، تراکم گیرنده‌های نوع  $D_2$  دوپامینرژیک بر روی نورون‌های هدف استریاتال به علت حالت تنظیم افزایشی زیاد می‌شود و بنابراین با تجویز داروهایی که مستقیماً بر روی گیرنده‌ها اثر می‌گذارند، فعالیت حرکتی در سمت چپ نسبت به راست بیشتر شده و حیوان به سمت مقابل یعنی سمت راست می‌چرخد (۴۵ و ۴۴ و ۴۳ و ۳۷). در این پژوهش موش‌های گروه تخریب که به پارکینسون مبتلا شده بودند پس از ۴ هفته به دنبال تزریق داخل صفاقی

آپومورفین تعداد چرخش به سمت راست بسیار قابل ملاحظه نسبت به دو گروه شاهد بدون تزریق و گروه کنترل با تزریق سالین آسکوربات نشان دادند که گواهی بر پارکینسونی شدن این موش‌ها و تخریب سیستم نیگرا استریاتال آن‌ها بود.

### بررسی بیان ژن‌ها به روش RT-PCR

در بررسی بیان ژن‌های FoxO3a، LC3، Atg13، Atg101، VPS34، Atg14L و GAPDH در مدل بیماری پارکینسون موش صحرایی به روش RT-PCR مشاهده شد که ژن‌های FoxO3a، LC3، Atg13، VPS34، GAPDH و Atg14L بیان شدند اما ژن Atg101 بیان نشد. نتایج شبه کمی حاصله از نرم‌افزار Image J بر روی ژل، تنظیم کاهشی ژن‌های FoxO3a، Atg13، VPS34 و Atg14L را در موش‌های گروه تخریب نشان داد. از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

پروتئین‌های FoxO به عنوان تنظیم کننده‌های مهم پروتئین‌های حیاتی مرتبط با عملکردهای گوناگون سلول هستند. هر یک از اعضای FoxO نقش‌های خاص دارند و از این میان FoxO3a به دلیل نقش منحصر به فردش در تکثیر سلول، آپوپتوز، متابولیسم، اداره‌ی استرس و عمر طولانی سلول بررسی زیادی شده است. FoxO3a همچنین در حفاظت سلول‌ها وقتی در معرض شرایط نامطلوب و استرس قرار می‌گیرند، شرکت می‌کند. ROS یا قطعات اکسیژنی فعال و رادیکال‌های آزاد تنظیم نشده آپوپتوز را القا می‌کنند. Sirtuin1 (sirt 1) سطوح ROS را کاهش می‌دهد و بقای سلول را تحت شرایط استرس

اکسیداتیو پیش می‌برد. FoxO3a و سایر خانواده‌ی FoxO، سوپر اکسید دیس موتاز (SOD) را افزایش داده و سلول‌ها را در یک مسیر وابسته به sirt 1 از استرس اکسیداتیو حفاظت می‌کنند (۱۴). فعال شدن FoxO ها منجر به بیان پروتئیل مجموعه‌ی بزرگی از ژن‌های هدف آن‌ها می‌شود که بسیاری از پروسه‌های سلولی شامل اتوفاژی را تنظیم می‌کنند. FoxO3 می‌تواند اتوفاژی را از طریق تنظیم افزایشی LC3، Gabarap، Vps34، ULK2 و Atg12 القا کند (۲۳). در این پژوهش ژن FoxO3a بیان شد و این موضوع نشان دهنده‌ی اینست که اتوفاژی در این بیماری فعال شده است و FoxO3a از طریق بیان ژن‌های هدف خود یعنی LC3 و Vps34 که در این تحقیق این ژن‌های هدف نیز بیان شدند، اتوفاژی را القا کرده است. پس این ژن در این بیماری و در راه اندازی اتوفاژی ایفای نقش می‌کند.

در مرحله‌ی شروع اتوفاژی کمپلکس (ULK1, ULK2, FIP200, ATG13, ATG101) فسفریله شده و فعال می‌شود (۲۱). از میان ژن‌های این کمپلکس بیان یا عدم بیان ژن ATG13 و ATG101 بررسی گردید و مشاهده شد که ATG13 بیان شد اما ATG101 بیان نشد. نقش فیزیولوژیکی Atg101 در مسیر اتوفاژی هنوز به خوبی مشخص نشده است. Atg101 از طریق Atg13 با کمپلکس ULK1-Atg13-FIP200 بر هم کنش می‌کند. برای اتوفاژی در پستانداران ضروری است. پایداری Atg13 و ULK1 بستگی به Atg101 دارد. Atg13 مستقیماً با Atg101 بر هم کنش می‌کند. Atg13 فعالیت (ULK1,2) را

تنظیم می‌کند (۵۰ و ۱۹). عدم بیان Atg101 ممکن است نشان دهنده‌ی این باشد که در مدل بیماری پارکینسون موش صحرایی کمپلکس ULK1 پایدار نمی‌تواند تشکیل شود.

Hironori Suzuki و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داده‌اند که Atg13 و پروتئین‌های LC3 برای تشکیل اتوفاگوزوم ضروری هستند. هر یک از ایزوفرم‌های انسانی LC3 با Atg13 از طریق ناحیه برهم‌کنشی LC3 در Atg13 یعنی LIR برهم‌کنش می‌کنند که برای تشکیل صحیح اتوفاگوزوم نیاز است (۵۶). هر دو ژن LC3 و Atg13 در هر سه گروه بیان شدند پس ممکن است در گروه‌های پارکینسونی همانند دو گروه شاهد و کنترل بر هم کنش این دو ژن برای تشکیل صحیح اتوفاگوزوم اتفاق افتد.

کمپلکس ULK1 فعال، پروتئین‌های ATG6 (Beclin1 در پستانداران) را به محل تشکیل اتوفاگوزوم بسیج می‌کند و فعالیت کمپلکس (VPS34( PI3KCIII, BECN1, ATG14L, VPS15 را برای شروع تشکیل اتوفاگوزوم پیش می‌برد (۲۱). از میان ژن‌های کمپلکس VPS34 بیان ژن‌های ATG14L و VPS34( PI3KCIII بررسی و مشاهده شد که این دو ژن در هر سه گروه بیان شدند.

مطالعات نشان داده‌اند که Atg14L منجر به تقویت فعالیت Vps34 lipid kinase می‌شود که برای تشکیل اتوفاگوزوم ضروری است. این تاثیر Atg14L بر روی فعالیت Vps34 kinase بستگی به بیان هم زمان Beclin1 دارد.

پژوهش‌ها نشان می‌دهند که Vps34 یک نقش اساسی در شروع اتوفاژی در مخمر و ارگانسیم‌های پیشرفته بازی می‌کند. Vps34 در دو کمپلکس بزرگ ایفای نقش می‌کند. در کمپلکس اول UVRAG و Atg14L درگیر می‌شوند و این کمپلکس در القای اتوفاژی دخیل است. در کمپلکس دوم Rubicon درگیر است و به نظر می‌رسد اتوفاژی را تنظیم می‌کند (۱۶).

ژن مورد بررسی ما از نظر بیان یا عدم بیان در مرحله‌ی elongation، ژن بود که این ژن در هر سه گروه موش‌ها بیان شد.

در طول elongation، کونجوگه‌ی Atg8- PE بر روی غشای فاگوفور قرار می‌گیرد و در بسیج محموله به اتوفاگوزوم شرکت می‌کند (۲۱) و بیان ژن LC3 می‌تواند بیانگر این باشد که ممکن است بسیج محموله به اتوفاگوزوم در مدل بیماری پارکینسون اتفاق افتد.

در مورد بیماری (NHD) Nasu-Hakola که یک اختلال اتوزومال مغلوب است، در مغزهای با مورد NHD الیگودندروسیت‌های Nogo-A-positive, CNPase-positive سالم باقی مانده در ماده‌ی سفید غیر دمیلینه شده، به شدت LC3 رایبان کردند و همچنین یوبی کوئیتین، یوبی کوئیتین ۱ و histone deacetylase 6 (HDAC6) را بیان کردند اما P62 و Beclin1 رایبان نکردند. تعداد زیادی از اسفروئیدهای آکسون نیز با LC3 در مغزهای NHD نشان دار شدند، اما در گروه کنترل LC3 بیان نشد. این یافته یک فرضیه‌ی جدید ارائه می‌دهد که تنظیم غیر عادی اتوفاژی ممکن است الیگودندروگلیوپاتی سببی از

لوکوانسفالوپاتی در مغزهای NHD را القا کند. موش‌هایی که نقص در اتوفاژی دارند نورودژنراسیون شدید همراه با تجمعات پروتئینی یوبی کوئیتینه نشان می‌دهند. به علاوه تنظیم غیر عادی اتوفاژی نقش اساسی در پاتوژنز بیماری‌های نورودژنراسیون انسان بازی می‌کند (۶۴).

کاهش بیان Beclin1 در بیماری آلزایمر مشاهده شده است که منجر به آسیب اتوفاژی و نورودژنراسیون می‌شود (۲۱ و ۲۲). پیش از این هم اثبات شده است که جهش ژن کد کننده LRRK2 مسئول نوعی از اتوزومال غالب PD است. جهش LRRK2 منجر به آسیب اتوفاژی و تجمع پروتئین‌های مارکر اتوفاژی LC3 و P62 می‌شود. DJ1 به عنوان یک میانجی‌گر اتوزومال مغلوب PD شناخته شده است. مطالعات اخیر همچنین یک ارتباط بین اتوفاژی و DJ1 یافته اند، به طوری که تخلیه‌ی DJ1 در انسان (در سلول‌های نورو بلاستوما) و دروسوفیلا منجر به نقص عملکرد میتوکندری و آسیب اتوفاژی می‌شود. ژن‌هایی نظیر  $\alpha$ -Synuclein، PARKIN و PINK1 شناسایی و ارتباط  $\alpha$ -Synuclein از طریق اتوفاژی و PARKIN و PINK1 از طریق میتوفاژی با PD اثبات شده است (۱).

## ۵-۲- نتیجه گیری

در این پژوهش بیان FoxO3a نشان داد که این ژن در القای شروع اتوفاژی در مدل بیماری پارکینسون نقش دارد. این موضوع نشان دهنده‌ی اینست که اتوفاژی در این بیماری در موش‌های صحرایی القا شده است و FoxO3a از طریق بیان ژن‌های هدف خود یعنی LC3 و Vps34 که در این

تحقیق این ژن‌های هدف نیز بیان شدند، اتوفاژی را القا کرده است. پس این ژن در راه اندازی اتوفاژی در مدل بیماری پارکینسون ایفای نقش می‌کند.

عدم بیان ژن Atg101 در موش‌های پارکینسونی نیز نشان می‌دهد که اتوفاژی در مدل بیماری پارکینسون موش صحرایی ناقص اتفاق افتاده است و مرحله‌ی شروع در اتوفاژی به طور کامل و صحیح اتفاق نیفتاده است. تنظیم کاهشی ژن‌های FoxO3a، Atg13، VPS34 و Atg14L در موش‌های پارکینسونی در مقایسه با موش‌های گروه کنترل و شاهد نیز می‌تواند بیان‌گر آسیب اتوفاژی در مرحله‌ی القا و شروع اتوفاژی در مدل بیماری پارکینسون باشد. تمام این موارد نشان می‌دهند که اتوفاژی یک نقش حیاتی در بیماری پارکینسون بازی می‌کند و عدم تنظیم آن منجر به ایجاد بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های نورودژنراتیو می‌شود. کشف راه‌کارهای درمانی که اتوفاژی را به میزان صحیح تنظیم نمایند می‌تواند منجر به ایجاد پیشرفت‌هایی در جهت کاهش از دست رفتن نورون‌ها شود و نورودژنراسیون را به تعویق بیندازد.

### ۵-۳- پیشنهادات

بهرتر است بیان و یا عدم بیان سایر ژن‌های درگیر در فرایند اتوفاژی نیز بررسی شوند تا نقایص موجود در فرایند اتوفاژی در مدل بیماری پارکینسون به طور کامل شناخته شود. فهم مکانیسم‌های



مولکولی بیماری پارکینسون می‌تواند منجر به کشف روش‌های درمانی نوین شود و نورودژنراسیون را به تعویق بیندازد.

## References

1. Lynch-Day, M.A., et al., The role of autophagy in Parkinson's disease. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(4): p. a009357.
2. Jimenez-Jimenez, F.J., et al., Cerebrospinal fluid biochemical studies in patients with Parkinson's disease: toward a potential search for biomarkers for this disease. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 369.
3. Brabo, N.C., T.S. Minett, and K.Z. Ortiz, Fluency in Parkinson's disease: disease duration, cognitive status and age. Arq Neuropsiquiatr, 2014. **72**(5): p. 349-55.
4. Mylène M, Sébastien M, Sophie CC, Jérôme L, Jevita P, Pierre V, Nicolaie G, Hervé V, Gérard B, Elisabeth S, Raymund S. Neurosurgery in Parkinson's disease: Social adjustment, quality of life and coping strategies. Neural Regen Res, 2013. **8**(30):2856-67.
5. Blandini, F. and M.T. Armentero, Animal models of Parkinson's disease. FEBS J, 2012. **279**(7): p. 1156-66.
6. zeigler, H. D. sand Alheid, G. F. basal ganglia in: paxions, G, the rat nervous system, 2 nd edition, academic press, 1996. P. 579-614.
7. ebadi, M. Srinivasan, S.K and Baxi, M.D. oxidative stress and antioxidant therapy in parkinsons disease, prog.neurobiol,1996. **48**: p. 1-19.
8. Sudipta Chakraborty, Julia Bornhorst, Thuy T. Nguyen and Michael Aschner., Oxidative Stress Mechanisms Underlying Parkinson's, Int. J. Mol. Sci, 2013. **14**: p. 23103-23128.
9. Sandy Stayte and Bryce Vissel. Advances in non dopaminergic treatments for Parkinson's disease. Frontiers in neuroscience, 2014. **113**(8): p. 1-29.
10. Jordi Clarimón\* and Jaime Kulisevsky. Parkinson's Disease: From Genetics to Clinical Practice. Current Genomics, 2013. **14**: p. 560-567

11. Ni, H.M., et al., Critical role of FoxO3a in alcohol-induced autophagy and hepatotoxicity. *Am J Pathol*, 2013. **183**(6): p. 1815-25.
12. Noboru Mizushima. Autophagy: process and function. *Genes Dev*, 2007. 21: p. 2861-2873.
13. Karl Grenier , Gian-Luca McLelland and Edward A. Fon. Parkin- and PINK1-dependent mitophagy in neurons: will the real pathway please stand up. *Frontiers in neurology*, 2013. 100(4): p. 1-8.
14. Nho, R.S. and P. Hergert, FoxO3a and disease progression. *World J Biol Chem*, 2014. **5**(3): p. 346-54.
15. Qiming Sun, Weiliang Fan, and Qing Zhong. Regulation of Beclin 1 in autophagy. *Autophagy*. 2009 July ; 5(5): 713–716
16. Funderburk, S.F., Q.J. Wang, and Z. Yue, The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol*, 2010. **20**(6): p. 355-62.
17. Taichi Hara , Akito Takamura , Chieko Kishi , Shun-ichiro Iemura , Tohru Natsume , Jun-Lin Guan , and Noboru Mizushima . FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J. Cell Biol*, 2008. 181(3): p. 497–510.
18. Kabeya, Y., et al., LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 13): p. 2805-12.
19. Liang, Q., et al., The *C. elegans* ATG101 homolog EPG-9 directly interacts with EPG-1/Atg13 and is essential for autophagy. *Autophagy*, 2012. **8**(10): p. 1426-33.
20. Wong P.S, Tan B.X. Leong S.M. and Lim T.M. Autophagy and GAPDH Increase in the Etiology of Acute Myeloid Leukemia With Nucleophosmin Mutation.
21. Nah, J., J. Yuan, and Y.K. Jung, Autophagy in neurodegenerative diseases: from mechanism to therapeutic approach. *Mol Cells*, 2015. **38**(5): p. 381-9.
22. Kesidou, E., et al., Autophagy and neurodegenerative disorders. *Neural Regen Res*, 2013. **8**(24): p. 2275-83.

23. Yang, J., et al., The regulation of the autophagic network and its implications for human disease. *Int J Biol Sci*, 2013. **9**(10): p. 1121-33.
24. Noda, T., K. Matsunaga, and T. Yoshimori, Atg14L recruits PtdIns 3-kinase to the ER for autophagosome formation. *Autophagy*, 2011. **7**(4): p. 438-9.
25. Andrew J lees, John Hardy, Tamas Revesz., Parkinson's disease. *Lancet*, 2009. 373: p.2055-66.
26. C. W. Olanow., W. G. Tatton., Etiology and pathogenesis of Parkinsons disease. *Annu. Rev. Neurosci*, 1999. 22: p.123-44.
27. Kato, S., Meshitsuka, S., Ohama, E., Tanaka, J., Liena, J.F. and Hirano. A., Increased iron content in the putamen of patient with steratonigral degeneration, *Acta Neuropath*, 1992. 84: p.328-330.
28. Anthony, E., Lang, M.D., Andres, M., Lozano, M.D., Parkinson's disease. *The new England journal of medicine*, 1998. 339: p. 1044-1053.
29. Fahn, S., Description of Parkinson's Disease as a Clinical Syndrome. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 2003. 991: p. 1-14.
30. Parent, A and Hazrati, L.N., Functional anatomy of the basal ganglia. The cortico-basal ganglia-thalamo cortical loop, *Brain. Res. Rev*, 1995. 20: p. 91-127.
31. RAVenscroft, P., and Brotchie, J., NMDA receptors in the basal ganglia., *J. Anat*, 2000. 456: p.577-585
32. Yelnik, J., Functional anatomy of the basal ganglia. *Movement disorders*, 2002. P. s19-s21.
33. Preston, R.J., Mccrea, R.A., Chang, H.T. and Kitai, S.T., Anatomy and physiology of substantia nigra and retrorubral neurons studied by extra and intra cellular recording and by horseradish peroxidase labeling., *Neurosci*, 1981. p.331-344.
34. Parent, A., Cote, P.Y. and Lavoie, B., Chemical anatomy pf primate basal ganglia, *Prog*,

- Neurobiol, 1995. 46: p.131-197.
35. Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays*, 2002. 24(4): p. 18-308.
  36. Gerlach M, Riederer P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *Journal of neural transmission*, 1996.103 (8.1041-987).
  37. Lotharius J, Dugan LL, O'malley KL. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *The Journal of neuroscience*, 1999. 19(4): p.1284-93.
  38. Gonzalez-Polo, R.A., Gomez-Sanchez, R., Sanchez-Erviti, L., M Bravo-San Pedro, J., Pizarro-Estrella, E., Niso-Santano, M., and M.Fuentes J. Autophagy: A possible defense mechanism in parkinsons disease.Intech, 2013. p.177-195.
  39. Schwarting, R.K.W, Bonatz, A.E, Carey, R.J. and Huston, J.P., Relationship between indices of behavioral asymmetries and neurochemical changes following mesencephalic 6-hydroxydopamine injection, *Brain Res*, 1991. 554: p.46-55.
  40. Schwarting, R.K.W. and Huston, J.P., The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research: analysis of functional deficits recovery and treatments., *prog Neurobiol*, 1996. 50: p.275-331
  41. Schwarting, R.K.W. and Huston, J.P., unilateral 6-hydroxydopamine lesion of mesostriatal dopamine neurons and their physiological sequelae, *prog. Neurobiol*, 1996. 49: p. 215-266.
  42. Sebastiano, A.M., and Ribeiro, J.A., Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system., *prog. Neurobiol*, 1996. 48: p.167-189.
  43. Gerach, M. and Riederer, P., Animal models of parkinsons disease: an empirical comparsion with the phenomenology of the disease in man., *J.Neural Trans*, 1996. 103:

- p.987-1041.
44. Miller, R. and Beninger, R.J., On the interpretation of asymmetries of posture and locomotion produced with dopamine agonists in animals with unilateral depletion of striatal dopamine., *progress in neurobiology*, 1991. 36: p.229-256.
  45. Tolwani, R.J., Jakowec, M.W., Petzinger, G.M., Green, S.H. And Waggle, K., Experimental models of parkinsons disease: Insight from many models, *Lab Animal Sci*, 1999. 4: p.363-371.
  46. Ichitani, Y., Okamura, H., Nakahava, D., Ngatsu I. and Ibata, Y., Biochemical and immunocytochemical changes induced by intrastriatal 6-OHDA injection in the rat nigrostriatal dopamine neuron system: evidence for cell death in substantia nigra., *Exp. Neurology*, 1994. 130: p. 269-178.
  47. Pan, T., Kondo, S., Le, W., Jankovic, J., The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain*, 2008. 131: p. 1969-1978.
  48. Pyo, J.O., Nah, J., Jung, Y.K., Molecules and their functions in autophagy. *Exp. Mol. Med*, 2012. 44(2): p.73-80.
  49. Dastoor, Z., Dreyer, J.L., Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. *Journal of Cell Science*, 2001. 114: p.1643-1653.
  50. Hosokawa, N., et al., Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy*, 2009. 5(7): p. 973-9.
  51. Shintani, M., Osawa, k., Role of autophagy in cancer. *INTECH*, 2013. p. 217-234.
  52. Backer, J.M., The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem. J.*(2008). 410: 1-17.
  53. Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., Codogno, P., Autophagy in health and disease. 1.

- Regulation and significance of autophagy: an overview. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010. 298: p. C776-C785.
54. Rajawat, Y.S., Bossis, I., Autophagy in aging and in neurodegenerative disorders. *HORMONES*, 2008. 7(1): p. 46-61.
  55. McLeod, I.X., et al., The class III kinase Vps34 promotes T lymphocyte survival through regulating IL-7Ralpha surface expression. *J Immunol*, 2011. **187**(10): p. 5051-61.
  56. Suzuki, H., et al., Structural basis of the autophagy-related LC3/Atg13 LIR complex: recognition and interaction mechanism. *Structure*, 2014. **22**(1): p. 47-58.
  57. Cadet, J.L., et al., Methamphetamine-induced dopamine-independent alterations in striatal gene expression in the 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rats. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e15643.
  58. Tillerson, J.L., et al., Forced nonuse in unilateral parkinsonian rats exacerbates injury. *J Neurosci*, 2002. **22**(15): p. 6790-9.
  59. Ma, Y., et al., The effects of unilateral 6-OHDA lesion in medial forebrain bundle on the motor, cognitive dysfunctions and vulnerability of different striatal interneuron types in rats. *Behav Brain Res*, 2014. **266**: p. 37-45.
  60. Boix, J., T. Padel, and G. Paul, A partial lesion model of Parkinson's disease in mice—characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion. *Behav Brain Res*, 2015. **284**: p. 196-206.
  61. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press; 1997.
  62. Thomas, J., et al., A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model: further biochemical and behavioral characterization. *Exp Neurol*, 1994. **126**(2): p. 159-67
  63. Lu, X., et al., The Parkinsonian mimetic, 6-OHDA, impairs axonal transport in dopaminergic axons. *Mol Neurodegener*, 2014. **9**: p. 17.

64. Satoh, J., et al., LC3, an autophagosome marker, is expressed on oligodendrocytes in Nasu-Hakola disease brains. *Orphanet J Rare Dis*, 2014. **9**: p. 68.
65. LP, X., LY, L., XF, F., ZQ, L., Autophagy is involved in 6-OHDA-induced dopaminergic cell death. *Nan Fang Yi Ke Da Xue*, 2010. 30(12): p. 2649-51.



## Abstract

**Background:** Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by protein aggregations in the cytoplasm of the dopaminergic neurons. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction have a critical role in the pathogenesis of PD. Autophagy is a conservative mechanism in response to cell stress. Dysregulation of autophagy results in proteins aggregations and damage of organelles in neurodegenerative diseases. The aim of this study is evaluation of autophagy genes expression in PD.

**Materials and methods:** Male wistar rats were divided into three groups as follows: control, sham (injection of ascorbate-saline solution into the left striatum) and lesion (injection of 6-OHDA dissolved in ascorbate-saline solution into the left striatum) groups. The apomorphine-induced rotation test was done one week before (base line) and four weeks after surgery. Then, rat's substantia nigra was extracted and RT-PCR was performed to detect expression of FoxO3a and the autophagy genes VPS34, Atg101, Atg14L, Atg13 and LC3.

**Results:** assessment of apomorphine-induced rotation test indicated significant contralateral rotations in the lesion group after four weeks compared to one week before surgery. By RT-PCR, lesion group expressed FoxO3a, VPS34, Atg14L, Atg13 and LC3 genes but did not express Atg101. Sham and control groups expressed all of these genes. FoxO3a, ATG13, ATG14L and VPS34 was downregulated in comparison with control and sham groups.

**Conclusion:** expression of FoxO3a suggests that this gene has a role on induction of autophagy in PD through expression of LC3 and VPS34. Lack of Atg101 expression and downregulation of FoxO3a, ATG13, ATG14L and VPS34 in parkinsonian rats may represent that the autophagy initiation process is probably deficient in PD.

**Keywords:** Parkinson's disease, autophagy, FoxO3a, apomorphine



**Qazvin University of Medical Sciences**

**Faculty of Medicine**

**Cellular and Molecular Research Center**

Thesis submitted for

Master of Science degree in Anatomy

**Title:**

**Evaluation of role of FoxO3a in wistar rat model of Parkinson disease**

Supervisor Professor by:

Dr. Sh. Darabi

Consultant Professor by:

Dr. F. Rajaei

Written by:

Zohreh Golmohammadi

Year of graduation: 2016

Registration number: 75